

**DER SUP1 - GENORT DER
HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE :
DIE NUKLEOTIDSEQUENZ DES WILDTYPS UND
EINER OMNIPOTENTEN SUPPRESSORMUTANTE**

PETER BREINING

1986

DER SUP1-GENORT DER HEFE SACCHAROMYCES CEREVISIAE:

DIE NUKLEOTIDSEQUENZ DES WILDTYPS UND EINER OMNIPO-

TENTEN SUPPRESSORMUTANTE

Dissertation

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Peter Breining

aus

Kirchheim/Teck

Juli 1986

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Piepersberg
 2. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
- Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.1986

Abkürzungen

A	Adenosin
A_x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin
Ci	Curie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanosin
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
Min.	Minute
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
$^{32}_P$	radioaktives Phosphorisotop der Massenzahl 32
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
tRNS	transfer Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheit
$^{35}_S$	radioaktives Schwefelisotop der Massenzahl 35
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
T	Thymin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Vol	Volumeneinheit
WT	Wildtyp



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	8
I. Organismen und Plasmide	8
II. Hefegenombanken	12
1. YEp13 - Bank	12
2. p3030 - Bank	12
III. Nährmedien	12
1. Medien für Bakterienanzucht	12
2. Medien für Hefeanzucht	13
IV. Anzuchtbedingungen	14
V. Präparation von DNS und RNS	15
1. Isolierung von Plasmiden aus E. coli	15
2. Isolierung von chromosomaler DNS aus Hefe	15
3. Isolierung von RNS aus Hefe	16
4. Anreicherung von mRNS	16
VI. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen, Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten	17
VII. Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation von E. coli bzw. Hefe	18

	Seite
VIII. Konstruktion von Plasmiden mit Nuklease B ^{al} 31	20
1 Verkürzung von Plasmiden mit Nuklease B ^{al} 31	20
2 Anheften von synthetischen "Linker"- Oligonukleotiden	20
IX. Sequenzierung von DNS	21
1 5'-Endmarkierung von DNS-Fragmenten mit ³² P-Phosphat	21
2 Basenspezifische Sequenzreaktionen	22
3 Polyacrylamidgelelektrophorese	22
X. Hybridisierungstechniken	23
1 Radioaktive Markierung von DNS durch Nicktranslation	23
2 Koloniefilterhybridisierung	23
3 DNS-DNS-Hybridisierung ("Southern-blot")	24
4 DNS-RNS-Hybridisierung ("Northern-blot")	24
XI. S1-Kartierung von Transkripten	25
XII. Klonierung des Allels sup1-ts36 aus dem Hefestamm 7B-D244	25
XIII. Isolierung von Ribosomen und Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus Hefe	26
1 Isolierung ribosomaler Proteine aus Hefe	26
2 Präparation von ribosomalen Unterein- heiten	27
3 Extraktion von ribosomalen Proteinen	28

	Seite
XIV. Gelelektrophorese von ribosomalen Proteinen	28
1 Eindimensionale Auftrennung	28
2 Zweidimensionale Auftrennung	29
XV. In vitro-Translation vom mRNA	29
1 Gewinnung der SUP1-spezifischen mRNA durch Hybridselektion	
2 Translation der mRNA in Retikulozytenlysat	29
XVI. Computerprogramme	30
XVII. Enzyme und besondere Chemikalien	30
C. ERGEBNISSE	32
I. Charakterisierung des Plasmids pYsupl-1	33
1 Physikalische Kartierung und Sukklo- nierung von Plasmid pYsupl-1	33
2 Test der von pYsupl-1 abgeleiteten Plasmide auf Komplementation der supl-ts36 Mutation	35
II. Isolierung und Charakterisierung von weiteren supl-ts36 komplementierenden Plasmiden	36
III. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten von Plasmid pYsupl-1 gegen Gesamt-DNS aus S. cerevisiae ("Genomischer Southern-blot")	40
IV. Hybridisierung von DNS des Plasmids pYsupl-1 gegen die DNS verschiedener Orga- nismen	42

	Seite
V. Hybridisierung von DNS des Plasmids pYsupl-1 gegen RNS aus Hefe	42
VI. In vitro-Translation des hybridselek- tierten SUP1-Transkripts mit Retikulo- zystenlysat	44
VII. Klonierung des supl-ts36 Allels aus Hefe	46
VIII. Nukleotidsequenz des SUP1-Gens und des supl-ts36 Allels	48
1 Strategie der Sequenzierung	48
2 Sequenzanalyse	50
IX. Lokalisation der supl-ts36 Mutation durch Fragmentaustausch	56
X. S1-Kartierung des Startpunkts der Trans- kription der SUP1-mRNS	58
XI. Eindimensionale und zweidimensionale Auf- trennung ribosomaler Proteine	61
 D. DISKUSSION	 63
I. Startpunkte für Transkription und Trans- lation	64
II. Interpretation der Nukleotidsequenz und der davon abgeleiteten Primärstruktur des SUP1-Proteins	65
III. Das Suppressorallel supl-ts36	71
IV. Möglicher Suppressionsmechanismus und mögliche Funktion des SUP1-Faktors	73
 E. ZUSAMMENFASSUNG	 76
F. LITERATURVERZEICHNIS	78

A. EINLEITUNG

Eine essentielle Stoffwechselleistung jeder Zelle ist die Umsetzung der genetischen Information von der Ebene der DNS bis hin zum Protein. Der Zwang, auf veränderte Umweltbedingungen möglichst schnell mit der Synthese des adäquaten Satzes an Enzymen zu reagieren, führte während der Evolution zur Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen den beiden Extremen der äußersten Geschwindigkeit und der größtmöglichen Genauigkeit in der Übertragung der genetischen Information. Die Erhaltung dieser Information muß im Verlauf der Prozesse der Replikation, der Transkription, der Aminoacylierung der tRNS und der Translation in möglichst hohem Maße kontrolliert werden.

Die eukaryontische Translation, die Proteinbiosynthese durch die 80S Ribosomen, weist eine Rate von 3×10^{-4} Fehlern pro translatiertem Codon auf (1). Dieser Wert ist die Summe der Fehler, die während der Beladung der tRNS Moleküle mit den passenden Aminosäuren und der Auswahl der beladenen tRNS Moleküle am Ribosom eintreten. Die mutative Veränderung bestimmter Bestandteile des Translationsapparates hat Abweichungen von der charakteristischen Fehlerrate zur Folge und beeinflusst die gesamte Genexpression der Zelle. Von Suppression sprechen wir, wenn als Resultat dieser Veränderung die Auswirkung einer primären Mutation auf der Ebene der Pro-

teinbiosynthese durch Fehleinbau von Aminosäuren, oder durch Translation von Stopcodons korrigiert wird.

In Prokaryonten und in Eukaryonten entsteht die Mehrzahl der zu beobachtenden Suppressormutationen durch Veränderungen in den Strukturgenen der tRNS Moleküle (Tab. 1). In fast allen Fällen konnte der Nukleotidaustausch im Anticodontriplett lokalisiert werden. Es wurden jedoch auch tRNS Suppressoren beschrieben, deren Basensubstitution an anderer Stelle des Moleküls erfolgte (2). Auch Veränderungen von Aminoacyl-tRNS-Synthetasen, die zur Fehlbeladung von tRNS Molekülen und somit zur Suppression führen, wurden beschrieben (3).

Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war das *sup1*-Gen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das zusammen mit einer anderen Suppressormutante (*sup2*) als erster rezessiver und omnipotenter Suppressor in Hefe entdeckt wurde (4). Die beiden Suppressorgene gehören unterschiedlichen Komplementationsgruppen an und liegen auf den Chromosomen II R (*sup1*) und IV R (*sup2*). Ähnliche Suppressorgene, die an gleicher Stelle des Hefegenoms kartieren, *sup45* bzw. *supP* (= *sup1*) und *sup35* bzw. *supQ* (= *sup2*) (5, 6) wurden auch von anderen Autoren beschrieben. Ein dominanter omnipotenter Suppressor, *SUP46*, der wie *sup1* auf Chromosom II R lokalisiert wurde (7,8), sowie 2 weitere omnipotente Suppressoren *sup43* und *sup44* (9), deren Position auf der Hefegenkarte noch nicht bekannt ist, wurden später aufgefunden.

Tabelle 1: UAA und UAG Suppressoren (10) von *S. cerevisiae*.

Genort	Eingebaute Aminosäuren		Effektivität	Arm von Chromosom
	UAA	UAG		
SUP2	Tyrosin	Tyrosin	hoch	IV R
SUP3	Tyrosin	nicht bestimmt	hoch	XV L
SUP4	Tyrosin	Tyrosin	hoch	X R
SUP5	Tyrosin	Tyrosin	hoch	Fragment 8
SUP6	Tyrosin	Tyrosin	hoch	VI R
SUP7	Tyrosin	Tyrosin	hoch	X L
SUP8	Tyrosin	nicht bestimmt	hoch	VIII R
SUP11	Tyrosin	Tyrosin	hoch	VI R
SUP16	Serin		mittel	XVI R
SUP17	Serin		mittel	IX L
SUP19	Serin		gering	V R
SUP22	Serin		gering	IX L
SUP26	Leucin		sehr gering	XII R
SUP27	Leucin		sehr gering	IV R
SUP28	Leucin		sehr gering	unbekannt
SUP29	Leucin		sehr gering	X L
SUP32	Leucin		sehr gering	unbekannt
SUP33	Leucin		sehr gering	unbekannt
SUP-RL1		Serin	hoch	III R
SUP52		Leucin	gering	X L
SUP53		Leucin	gering	III L
SUP54		Leucin	gering	VII L
SUP55		Leucin	gering	unbekannt
SUP56		Leucin	gering	unbekannt

Die Omnipotenz dieser Suppressorgene, im Gegensatz zu tRNS-Suppressoren, die nur eines bzw. zwei der "nonsense"-Codons translatieren, wurde von den Autoren mit dem Proteincharakter dieser Hefesuppressoren, analog zu den ram (ribosomal ambiguity) -Mutationen bei *Escherichia coli* (11, 12) erklärt. Die Anzahl von 26 bis 27 verschiedenen Mutationsorten in ein und demselben Genort, nämlich sup1, die alle zum gleichen Suppressor-Phänotyp führen (13) stützt diese Hypothese. Zahlreiche pleiotrope Defekte, die mit der Suppression einhergehen und meist auf eine Schädigung der Proteinbiosynthese hinweisen, deuten an, daß ribosomenassoziierte Proteine als Genprodukt der Suppressoren in Frage kommen (14).

So sind Hefestämme mit omnipotenten Suppressoren oft temperatursensitiv oder auch kältesensitiv (6). Die Translation von "nonsense"-Codons bei permissiver Temperatur ermöglicht das Wachstum der Zellen trotz des Besitzes von Auxotrophiemarkern, während nach einem "shift" zu nicht permissiven Temperaturen die Proteinbiosynthese der Zellen stoppt.

Für einen sup2-Stamm konnte gezeigt werden (15), daß bei restriktiver Temperatur Peptidyl-tRNS Moleküle nicht ordnungsgemäß freigesetzt wurden und den Zerfall der Ribosomen in Untereinheiten verhinderten. Die Auflösung der Polysomen und die Akkumulation der ribosomalen Partikel in Form von 80S Monosomen führte zum Erliegen der Proteinbiosynthese. Ein Protein des Translationsapparates, das die geschilderten Schädigungen auslösen konnte, muß an zwei

ribosomalen Funktion beteiligt sein: An der Kontrolle der korrekten Codon-Anticodonpaarung und an der Freisetzung (Translationstermination ?) vollständig polymerisierter Peptidketten. Die beeinträchtigte Reifung der 60S Untereinheiten, die bei einem *supl*-Stamm beobachtet wurde (16), läßt nach Meinung der Autoren auf einen strukturellen Defekt schließen, der vom mutierten *SUP1*-Genprodukt bewirkt wird.

Ein weiterer für das Verständnis der Funktion interessanter Phänotyp der omnipotenten Suppressoren ist die Hypersensitivität von Stämmen, die eines dieser Allele besitzen, gegenüber bestimmten Aminoglykosidantibiotika, wie z.B. Paromomycin (17). Weiterhin wurde gezeigt, daß Paromomycin, wie auch andere Aminoglykoside, das Wachstum von Hefestämmen mit supprimierbaren Auxotrophien durch phänotypische Suppression (18) in Abwesenheit des Supplements ermöglichen können.

Die *in vitro*-Translation einer synthetischen poly(U)-RNS durch WT-Ribosomen führt nach Zugabe von Paromomycin zu erhöhten "misreading"-Raten. Ähnlich erhöhte "misreading"-Raten sind für Ribosomen der Suppressorstämmen in Abwesenheit des Antibiotikums beschrieben worden (19). Genotypische Suppression (durch *sup* oder *SUP* Allele) und phänotypische Suppression (durch Paromomycin) haben also die gemeinsame Ursache der erhöhten ribosomalen Ambiguität. Ursache der Hypersensitivität könnte somit die nicht mehr tolerierbare Steigerung der per se erhöhten Ambiguität der Ribosomen von Suppressorstämmen

durch Paromomycin darstellen. Daß beide Faktoren (sup-Allel und Paromomycin) verknüpft sind, belegt die Tatsache, daß sich in Suppressorstämmen das Spektrum der translatierten "nonsense"-Allele in Anwesenheit von sublethalen Paromomycinkonzentrationen verändert (17). Synergistisch bewirkt dies eine Erweiterung der Suppressoraktivität auf bestimmte amber- und opal-Tripletts. Umgekehrt wirkt das Antibiotikum restriktiv auf die Suppression eines ochre-Codons (his 7-1), das sowohl genotypisch (durch sup-Allel) als auch phänotypisch (durch Paromomycin) supprimierbar ist. Als Ursache nennen die Autoren einen Effekt des Paromomycins auf die Heferibosomen wie Streptomycin ihn auf die Ribosomen von *E. coli* hat (20). Durch die paromomycinbedingte Änderung der ribosomalen Konformation wird die Affinität bestimmter tRNS Spezies geändert.

Auf die Analogie der omnipotenten Hefesuppressoren mit den ram-Mutanten in *E. coli* wurde bereits hingewiesen. In dem Bakterium entstehen diese Mutationen in zwei Genorten, die Strukturgene der ribosomalen Proteine S4 (ram A und S5 (ram C) der 30S Untereinheit der Ribosomen sind (21). Lediglich für den bereits erwähnten dominanten Suppressor SUP46 (22) konnte die Veränderung eines Proteins der 40S Untereinheit des Heferibosoms als Ursache der Suppressoraktivität nachgewiesen werden. Ähnliches könnte in sup2 Mutanten von *S. cerevisiae* der Fall sein.

Bisher wurden Möglichkeiten angesprochen, die die zu Anfang erwähnte "mittlere" Genauigkeit der Ribosomen von Prokaryon-

ten und von Eukaryonten durch Erhöhung der Ambiguität (genotypisch und phänotypisch) weiter senken. Den umgekehrten Effekt d.h. die Steigerung der Genauigkeit der Translation durch die Verringerung der intrinsischen Ambiguität der Ribosomen, haben bei *E. coli* Mutanten im *strA* (*rpsL*) Locus (ribosomales Protein S12) (21).

Als Parallele hierzu können in Hefe verschiedene Anti-suppressoren (*asu9* und *ASU10*) gelten (23), die als Revertanten der Suppressorstämme mit *sup1* bzw. *sup2* Allel isoliert wurden. Die Selektion von zwei *asu9* Mutanten (Allel 5 und 6) als paromomycinresistente Revertanten einer *sup1* Mutante ist ein deutliches Anzeichen, daß die für *E. coli* beschriebene Kopplung zwischen dem Resistenzniveau gegenüber Streptomycin und der beobachteten "mis-reading"-Rate (d.h. Ambiguität) bzw. die sich gegenseitig analog beeinflussende und teilweise kompensierende Wirkung zweier ribosomaler Mutationen (z.B. *ramA/strA*) (24,25) auch für Hefe gültig ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des *SUP1*-Gens von Hefe sowie der *sup1* Mutation. Zunächst sollte versucht werden, das Genprodukt zu identifizieren. Im weiteren sollte die Genetik des *SUP1*-Genorts durch Sequenzierung, Transkriptionsanalyse und Expressionsstudien genauer untersucht werden. Das *SUP1* Genprodukt erwies sich dabei als ca. 50kd großes Protein mit eher saurem IEP. Mögliche Funktionen dieses Proteins im Translationsapparat von *S. cerevisiae* werden diskutiert.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Organismen und Plasmide

Tabelle 2: Organismen

Organismus	Genotyp	Herkunft
<u>Hefestämme</u> (<i>S. cerevisiae</i>)		
DBY747	<u>a</u> , his3, leu2, ura3, trp1	YGSC
S288C	α , SUC2, mal, gal2, CUP1	YGSC
7B-D244	α , his3-11,15, leu2-3,112 (adel-14) ^{sup1-ts36} par ^S	M.D. Ter- Avanesyan
6B-D244	<u>a</u> , his3-3,15, leu2-3,112, lys2 (adel-14) ^{sup2-ts36} par ^S	M.D. Ter- Avanesyan
ts368 (rna2-1)	adel, ade2, ura1, his7, lys2, tyr1, gal1	C.P. Hollen- berg
<u>Bakterienstämme:</u> Derivate von <i>Escherichia coli</i>		
c600	thi-1, thr-1, leu86, hsdK ⁻ lacY1, supE44, tonA21, λ^- , F ⁻	Laborsammlung
HB101	hsdR, hsdM, recA13, supE44 lacZ4, leu86	Boyer und Roulland- Dussoix (26)

Tabelle 3: Plasmide

a) Vektorplasmide

Plasmid	Größe (kb)	vermittelte Antibiotika-resistenz bzw. Prototrophie	Referenz
pBR322	4,36	Ampicillin, Tetracyclin	Bolivar et al. (27)
pACYC184	3,97	Chloramphenicol, Tetracyclin	Chang und Cohen (28)
pACYC177	3,67	Kanamycin, Tetracyclin	Chang und Cohen (28)
YEpl3	10,7	Ampicillin, Tetracyclin, LEU2	Broach et al. (29)
p3030	10,3	Ampicillin, Tetracyclin, HIS3	Hohn und Hinnen (30)

b) Rekombinierte Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pYsup1-1	16,6	6,3 kb Sau3A-Partialfragment (DNS von S288 C) in p3030 BamHI	Breining et al. (31)
pYsup1-2	23	12,3 kb Sau3A-Partialfragment in YEpl3 BamHI	diese Arbeit
pYsup1-4	17	6,3 kb Sau3A-Partialfragment in YEpl3 BamHI	diese Arbeit
pYCII-3	16,6	5,9 kb Sau3A-Partialfragment in YEpl3 BamHI	diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pPBM2	5,2	1,54 kb HindIII/ClaI-Fragment aus pYsupl-1 in pACYC177 HindIII/ClaI	diese Arbeit
pPBM3	10,4	1,54 kb XbaI/SalI-Fragment aus pYsupl-1 in p3030 XbaI/SalI	diese Arbeit
pPBM4	7,4	aus pYsupl-1 wurde 9 kb XbaI-Fragment deletiert	diese Arbeit
pPBM6	14	4,07 kb BamHI/SalI-Fragment aus pYsupl-1 in p3030 BamHI/SalI	diese Arbeit
pPBM8	11,4	2,65 kb BamHI/XbaI-Fragment aus pYsupl-1 in p3030 BamHI/SalI	diese Arbeit
pPBM9	1,9	BamHI/XbaI-Fragment aus pYsupl-1 in p3030 BamHI/XbaI	diese Arbeit
pPBM10	9,9	5,9 kb HindIII-Fragment in pACYC184 HindIII	diese Arbeit
pPBM101	8,45	aus pPBM10 1,45 kb SalI-Fragment deletiert	diese Arbeit
pPBM102	6,1	2,65 kb BamHI/XbaI-Fragment aus pPBM10 in pACYC184 BamHI/XbaI	diese Arbeit
pPBM103	4,85	1,4 kb BglII/XbaI-Fragment aus pPBM10 in pACYC184 BamHI/XbaI	diese Arbeit
pPBM104	3,8	1,5 kb HpaI/XbaI-Fragment aus pPBM10 in pACYC184 HincII/XbaI	diese Arbeit
pPBM13	14,7	aus pYsupl-1 1,9 kb SalI-Fragment deletiert	diese Arbeit
pPBM16	6	3,25 kb BamHI/ClaI-Fragment in pACYC177 BamHI/ClaI	diese Arbeit

Plasmid	Größe (kb)	Konstruktion	Referenz
pPBM24	8,45	Insert entspricht dem von pPBM101, Konstruktion siehe Abb. 9	diese Arbeit
pPBM25	9,9	Insert entspricht dem von pPBM10, DNS jedoch von supl-ts36 Allel, Konstruktion siehe Abb. 9	diese Arbeit
pPBM26	14	gleich wie pPBM6	diese Arbeit
pPBM27	14	gleich wie pPBM6, DNS jedoch von supl-ts36 Allel	diese Arbeit
pPBM40	6,1	gleich wie pPBM102	diese Arbeit
pPBM41	6,1	gleich wie pPBM102	diese Arbeit
pPBM42	11,08	0,78 kb AccI/EcoRV-Fragment mit BamHI "Linker" in p3030 BamHI	diese Arbeit
pPBM43	11,3	1,0 kb BamHI/EcoRV-Fragment mit BamHI "Linker" in p3030 BamHI	diese Arbeit
pPBM45	11,95	1,65 kb EcoRV/XbaI-Fragment mit BamHI "Linker" in p3030 BamHI	diese Arbeit
pPBM44	12,09	1,79 kb BamHI/AccI-Fragment mit BamHI "Linker " in p3030 BamHI	diese Arbeit
pPBM102-8, -76, -130, -150, -151		pPBM102 mit BglII linearisiert. Bal31-Abbau. Hind III "Linker" angehängt und rezirkularisiert.	diese Arbeit

II. Hefegenombanken

1 YEpl3 - Bank

Diese Genombank wurde durch Insertion von Sau3A-Partialfragmenten (3-8 kb) in die BamHI Schnittstelle des Schaukelvektors YEpl3 hergestellt (32). Die entstandenen Plasmide wurden in *E. coli* c600 transformiert. Etwa 3800 Kolonien wurden in LB-Medium mit 50 % Glycerin in Mikrotiterplatten bei -70°C aufbewahrt.

2 p3030 - Bank

Diese Genombank wurde durch Insertion von Sau3A-Partialfragmenten (28-40 kb) in die BamHI Schnittstelle des Cosmids p3030 hergestellt (B. Hohn, persönliche Mitteilung (30)). Die entstandenen Plasmide wurden in λ -Phagen verpackt und in *E. coli* c600 transformiert. Die Aufbewahrung von etwa 2800 Kolonien erfolgte entsprechend der YEpl3-Genombank.

III. Nährmedien

1 Medien für Bakterienanzucht

M9 - Minimalmedium:

0,6 % Na_2HPO_4

0,3 % KH_2PO_4

0,05 % NaCl

0,1 % NH_4Cl

0,025 % MgSO_4

Nach dem Autoklavieren wurden steril zugegeben:

- 15 µg/ml CaCl_2
- 5 µg/ml Vitamin B1
- 0,4 % Glucose
- 0,2 % Aminosäuren

LB - Vollmedium

- 1 % Trypton (Bacto)
- 0,5 % Hefeextrakt (Bacto)
- 0,5 % NaCl

Feste Nährmedien enthielten 1,5 % Agar. Zur Herstellung von Selektivmedien wurden Antibiotika in folgender Konzentration zugesetzt:

- 100 µg/ml Ampicillin
- 20 µg/ml Chloramphenicol
- 25 µg/ml Kanamycin
- 25 µg/ml Tetracyclin

2 Medien für Hefeanzucht

SD - Minimalmedium:

- 0,67 % Yeast nitrogen base w/o aminoacids (Difco)
- 2 % Glukose

Bei Bedarf mit Supplementen folgender Konzentration:

- 30 µg/ml Leucin
- 20 µg/ml Histidin
- 20 µg/ml Tryptophan
- 30 µg/ml Lysin
- 40 µg/ml Adenin

SD - Agarplatten enthielten 2 % hochreinen Agar (Merck).

YPAD - Vollmedium

- 1 % Hefeextrakt (Bacto)
- 2 % Pepton (Bacto)
- 2 % Glukose
- 40 µg/ml Adenin

YPAD - Agarplatten enthielten 2 % Agar (Bacto)

Regenerationsagar

- 0,67 % Yeast nitrogen base w/o aminoacids (Difco)
- 2 % Glukose
- 1 M Sorbit
- 3 % Agar hochrein (Merck)

Bei Bedarf supplementiert wie SD - Medium

IV. Anzuchtbedingungen

Stämme von *E. coli* oder Hefe wurden bei 30°C oder bei 37°C auf den jeweiligen Agarmedien oder in Erlenmeyerkolben in Wasserbadschüttlern (Modell G 76 New Brunswick Scientific) bzw. in einem 37°C Brutraum auf Tischrundschüttlern (Modell TR 1 Braun Melsungen) angezogen. Temperatursensitive Hefestämme wurden bei 25°C inkubiert.

V. Präparation von DNS und RNS

1 Isolierung von Plasmiden aus E. coli

Schnellpräparationen von Plasmiden wurden entweder nach der Methode von Kado und Liu (33) oder nach der Methode der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz et al. (34) durchgeführt.

Um Plasmid-DNS in präparativem Maßstab zu isolieren, wurden Zellen in Anwesenheit des geeigneten Antibiotikums in 1 Liter LB-Medium bis zu einer optischen Dichte ($O.D._{420}$) von 0,7 angezogen und nach Zugabe von 170 µg/ml Chloramphenicol über Nacht weitergeschützt. Die Gewinnung des Plasmids erfolgte dann nach der Methode des "cleared lysate" (35) oder durch alkalische Lyse. Die Abtrennung chromosomaler DNS erfolgte durch zweimalige CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.

2 Isolierung von chromosomaler DNS aus Hefe

Die Gewinnung von Gesamt-DNS aus Hefe erfolgte nach der Methode von Cryer et al. (36). Die Zellen wurden nach Waschen in EDTA-Puffer (50 mM, pH 7,5) und Präinkubation mit β -Mercaptoäthanol (1/40 Vol) mit Zymolyase 5000 (Kirin Brewery, Japan) sphäroplastiert (0,25 mg Enzym/Gramm Zellen, 1-2 h bei 37°C in 1 M Sorbit, 100 mM EDTA pH 7,5) und nach Zugabe von Proteinase K (75 µg/ml) mit SDS (1 % Endkonzentration) lysiert. Nach Deproteinierung mit 1 Vol Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) wurde die DNS aus der wässrigen Phase an der Phasengrenze zwi-

schen Puffer und überschichtetem Äthanol auf einen Glasstab gewickelt, mit RNase (45 µg/ml Suspension, 1 h bei 37°C) inkubiert und mit Isopropanol (0,54 Vol) gefällt. Nach Aufwickeln auf einen Glasstab wurde die DNS in 1 x SSC in Fraktionen bei 4°C aufbewahrt.

3 Isolierung von RNS aus Hefe

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus Hefe erfolgte nach einer modifizierten "hot-phenol" Methode wie von Domdey et al. (37) beschrieben. Die Zellen wurden in NaAc-Puffer (pH 5) gewaschen, in Puffer/Phenol (1 Vol NaAc-Puffer, 1/10 Vol 10 % SDS, 1 Vol Phenol mit NaAc-Puffer äquilibriert) suspendiert und bei 65°C mit Glasperlen aufgebrochen. Mit 1 Vol Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (50:48:2) wurde die wässrige Phase mehrfach extrahiert, bis nach Zentrifugation keine Interphase mehr entstand (mindestens 5 x). Nach Ausfällen mit Äthanol wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt.

4 Anreicherung von mRNS

Die Anreicherung von poly (A)⁺-RNS aus Gesamt-RNS wurde über eine oligo d(T)-Zellulose-Säule nach der Vorschrift von Maniatis et al. (38) erreicht. In H₂O suspendierte oligo d(T)-Zellulose wurde 2 cm hoch in Pasteurpipette gefüllt und nacheinander gewaschen mit: -H₂O (10 ml), -0,1 N NaOH (10 ml), -Hochsalzpuffer (50 ml, 20 mM Tris/Cl pH 7,6, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS). Die RNS wurde in 2,5 ml Elutionspuffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,05 % SDS) 3 Min. bei 65°C inkubiert, mit NaCl wurde auf eine Endkonzentration von

0,5 M eingestellt und auf die Säule aufgebracht (2 x aufgetragen). Die Säule wurde anschließend mit 50 ml Hochsalzpuffer gewaschen und die poly (A)⁺-RNS mit 8 ml Elutionspuffer direkt in eine Vorlage aus 20 ml Äthanol eluiert.

VI. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen, Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten.

Die Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen erfolgte bei den vom Hersteller der Enzyme vorgeschriebenen Bedingungen bezüglich Restriktionspuffer, Enzymmenge und Inkubationstemperatur.

Die DNS-Fragmente, die durch Restriktionsabbau entstanden waren, wurden in horizontalen Agarosegelen (0,7 % - 1,6 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte submers in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8) nach Peacock und Dingman (39) bei 100 V für ca. 4 h oder bei 25 V über Nacht.

Um die DNS-Banden im UV-Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar zu machen, enthielten sowohl Gel als auch Puffer während des Laufes Ethidiumbromid der Konzentration 1 µg/ 1 ml.

Abhängig von der Art der verwendeten Agarose erfolgte die Isolierung der DNS-Fragmente nach folgenden Methoden:

- a) Elektrophoretisch bei normalen Agarosegelen

Die DNS-Bande wurde ausgeschnitten und das Agaro-

sestück in einen Visking Dialyseschlauch (Porendurchmesser ca. $24 \text{ \AA}$) überführt. Nach 6 h Elektroelution bei ca. 40 mA wurde ca. 10 Sek. umgepolt, die DNS-Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt und mit Äthanol ausgefällt.

- b) Durch Phenolextraktion bei "low gelling temperature" Agarose.

"Low gelling temperature" Agarosegele wurden wie oben beschrieben, jedoch im Kühlraum zur präparativen Trennung von DNS verwendet. Nach Ausschneiden eines Gelstückes mit der zu isolierenden DNS-Bande wurde die Agarose geschmolzen (5 Min., 68°C) und mit 0,1 M Tris/Cl, pH 8 gesättigtem Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wurde nacheinander mittels Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1) und Chloroform: Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Abschließend erfolgte eine Fällung mit Äthanol.

VII. Ligation von DNS-Fragmenten und Transformation von E. coli bzw. Hefe.

Die mit Restriktionsendonukleasen gespaltene Vektor-DNS und das zu klonierende DNS-Fragment wurden über Nacht bei 4°C mit T 4-Ligase in 20 mM Tris/Cl pH 7,6, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Dithioerythrit, 0,6 mM ATP inkubiert. In einigen Fällen wurde die Vektor-DNS vorher mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt (s. IX. 1). Dabei wurde durch eine 5' Dephosphorylierung der Vektor-DNS die Zirkularisierung derselben verhindert.

Die Kontrolle des Ligationserfolgs geschah durch Auftrennen der Ligationsansätze vor bzw. nach der Ligation auf Agarosegelen.

Die *E. coli* Stämme c600 bzw. HB101 wurden nach der Methode von Cohen et al. (40) mit Plasmid-DNS oder Ligationsansätzen transformiert.

Die Transformation des Hefestammes 7B-D244 mit Plasmid-DNS bzw. Ligationsansätzen erfolgte anfangs nach der Methode von Hinnen et al. (41). Die Hefezellen wurden nach Waschen mit H_2O mit Zymolyase 5000 späroplastiziert (0,8 mg Zymolyase/10 ml in 1 M Sorbit, 1 h bei 30°C), mit 1 M Sorbit (3 x) gewaschen und in 0,8 ml STC aufgenommen (1 M Sorbit, 10 mM Tris/Cl pH 5, 10 mM $CaCl_2$). Nach Zugabe der DNS (10 - 20 µg/ml Endkonzentration) wurden 10 Vol 40 % PEG 4000 zugegeben. Die Zellen wurden nach Waschen mit 1 M Sorbit in 10 ml Regenerationsagar (45°C) überführt und auf die entsprechenden Platten mit Regenerations-Basis-agar aufgegossen.

Später fand die schneller durchführbare Methode von Ito et al. (42) Anwendung. Die Zellen wurden nach Waschen mit TE in TE aufgenommen (Titer 2×10^8) und nach Zugabe von 1 Vol 0,2 M Li-Acetat inkubiert (1 h bei 30°C leicht schütteln). Nach Zugabe der DNS (10 - 20 µg/ml) und PEG-Behandlung (Zusatz von 1 Vol 70 % PEG 4000) wurden die Zellen mit H_2O gewaschen (2 x) und auf entsprechend supplementiertes SD-Agarmedium plattiert.

VIII. Konstruktion von Plasmiden mit Nuklease Bal31

1 Verkürzung von Plasmiden mit Nuklease Bal31

Zur limitierten Deletion von in Plasmiden inserierter DNS wurden diese durch Spaltung mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert und mit Bal31 inkubiert. Die Inkubationsdauer und Inkubationstemperatur für die Nukleasespaltung wurden für eine gegebene Plasmidmenge so optimiert, daß ein Abbau zu der erwünschten Fragmentlänge (auf Agarosegelen getestet) erzielt wurde. Generell wurden die von Maniatis et al. (38) beschriebenen Bedingungen eingehalten. Das Abstoppen der Reaktion mit Äthylenglykol-bis (2-aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure der Enkonzentration von 20 mM mit anschließender Äthanol-fällung erwies sich als ausreichend wirksam, so daß sich eine Extraktion mit Phenol: Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1) erübrigte.

2 Anheften von synthetischen "Linker"-Oligonukleotiden

Vor der Ligation von sogenannten "Linkern" an die Bal31 verkürzten DNS-Fragmente mußten diese "blunt-end" gemacht werden. Dies erfolgte durch Inkubation der DNS-Fragmente mit dem großen Fragment der DNS-Polymerase I ("Klenow Fragment") in Anwesenheit aller vier dNTP's in dem von Maniatis et al. (38) beschriebenen Puffersystem.

Anschließend erfolgte eine Spaltung der "Linker" mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease, um kohäsive Enden zu erzeugen. Nach Auftrennung in Aga-

rosegelen wurden die entsprechenden Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten, wie unter B. VI. beschrieben isoliert, der Ligation unterworfen und in *E. coli* transformiert.

Diente die Verkürzung lediglich dazu, einen bestimmten Abschnitt eines Plasmids zu sequenzieren, erfolgte die Auswahl des "Linkers" so, daß eine neue, nur einmal auftretende Restriktionsschnittstelle geschaffen wurde. Die endgültige Auswahl der gewünschten, verkürzten Plasmide geschah durch Restriktionsanalyse an Plasmidpräparationen, die wie unter B. IV. 1 beschrieben, gewonnen worden waren.

IX. Sequenzierung von DNS

Die Sequenzierung von DNS erfolgte generell nach der Methode von Maxam und Gilbert (43). Die Plasmide wurden zuerst mit einer Restriktionsendonuklease A gespalten und anschließend am 5'-Ende markiert (s.u.). Nach dem Nachschneiden mit einer zweiten Restriktionsendonuklease B wurden alle Fragmente in Agarosegelen aufgetrennt.

Die gewünschten Fragmente, die jetzt nur noch ein radioaktiv markiertes Ende aufwiesen, wurden durch Elektrophorese auf Agarosegelen isoliert und in die Sequenzreaktionen eingesetzt.

1 5'-Endmarkierung von DNS-Fragmenten mit ³²Phosphat

Die DNS-Fragmente, deren 5'-Ende radioaktiv markiert werden sollte, wurden zunächst mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt, um die 5'-

Phosphatgruppe abzuspalten (50 mM Tris/Cl pH 8, 0,01 Einheiten pro pMol Enden, 30 Min. bei 37°C). Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte wie von Maniatis et al. (38) beschrieben.

Die 5'-Markierung erfolgte durch Inkubation der dephosphorylierten DNS-Fragmente mit 50 μCi γ - ^{32}P -ATP der spezifischen Aktivität 7000 Ci/mMol (NEN) und 10 Einheiten T4-Polynukleotidkinase (Boehringer).

2 Basenspezifische Sequenzreaktionen

Mit Ausnahme der (A+G)-spezifischen Reaktion, die nach Gray et al. (44) erfolgte, wurden die basenspezifischen Modifikationsreaktionen wie von Maxam und Gilbert (43) beschrieben durchgeführt.

3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Sequenzierungsansätze erfolgte in 6 %, 8 % und 20 % Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff bei maximal 3200 V mit TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA, pH 8,3) als Gel- und Laufpuffer. Alle Sequenzgelläufe wurden bei der konstanten Temperatur von 62°C durchgeführt (in der Werkstatt hergestellte thermostatisierbare Glasplatten). Die Polyacrylamidgele wurden in einer Stärke von 0,2 mm gegossen und waren 59 cm lang und 17 cm breit. Zur Kontrolle der Lauflänge dienten Bromphenolblau und Xylen-grün. Zur Herstellung der Gele wurde die Gellösung zwischen zwei Glasplatten gegossen. Eine dieser Glasplatten war vorher silanisiert (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan) worden, so daß das Gel nach Laufende daran haften blieb.

Nachdem der Harnstoff mit 10 % Essigsäure ausgewaschen worden war, wurden die Gele bei 80°C 30 Min. lang eingetrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Ray 90) direkt auf das trockene Gel aufgelegt und 24 h bei Raumtemperatur exponiert.

X. Hybridisierungstechniken

1 Radioaktive Markierung von DNS durch Nicktranslation

Die Herstellung einer radioaktiv markierten DNS-Probe geschah nach der von Maniatis et al. (38) gegebenen Vorschrift. Dazu wurden DNS-Restriktionsfragmente über Gelelektrophorese aufgetrennt, eluiert (s. B. VI.) und in die Nicktranslationsreaktion eingesetzt.

2 Koloniefilterhybridisierung

Diese Methode diente dem Nachweis bestimmter DNS-Fragmente des Hefegenoms in einer Bank genomischer DNS (s. B. II.), die in einem Hefe/E. coli Schaukelvektor kloniert worden war. Dazu wurden jeweils E. coli Kolonien der Hefegenombanken auf einem Nitrozellulose-rundfilter (Durchmesser einer Petrischale, Porendurchmesser 0,45 µm, BA85 der Firma Schleicher & Schüll) ausgestempelt und in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Filter wurden dann abgenommen und auf Platten überführt, die zusätzlich Chloramphenicol der Konzentration 100 µg/ml enthielten, um selektiv Plasmid-

DNS zu amplifizieren. Die weitere Durchführung richtete sich nach der von Grunstein und Hogness (45) beschriebenen Methode.

3 DNS-DNS-Hybridisierung ("Southern-blot")

Bei dieser Methode wird DNS mit Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter (s. B. X. s) transferiert und anschließend gegen ein homologes DNS-Fragment, das wie unter B. X. 1 beschrieben, durch Nicktranslation radioaktiv markiert worden war, hybridisiert. Die Durchführung der Methode geschah entsprechend den Anleitungen von Southern (46) bzw. von Schleicher und Schüll (47).

4 DNS-RNS-Hybridisierung ("Northern-blot")

Gesamt-RNS oder poly (A)⁺-RNS wurde mit dem von Lehrach et al. (48) beschriebenen Gelsystem in Probenpuffer (0,16 Vol 38 % Formaldehyd, 0,04 Vol Phosphatpuffer, 0,5 Vol Formamid, 0,2 Vol Glycerin, 0,1 Vol 0,1 % Bromphenolblau) aufgenommen und 2 Min. bei 60°C erwärmt. Die Auftrennung erfolgte 2 - 3 h bei konstant 60 V in Laufpuffer (600 ml 38 % Formaldehyd, 135 ml Phosphatpuffer, 3000 ml H₂O). Anschließend wurde die RNS wie von Schleicher und Schüll (47) beschrieben auf Nitrozellulose transferiert. Die Hybridisierung gegen eine radioaktive DNS-Probe folgte den Angaben von Thomas (49) bzw. Schleicher und Schüll (47).

XI. S1-Kartierung von Transkripten

Zur genauen Festlegung des Transkriptionsstarts der supl-spezifischen mRNS wurde poly (A)⁺-RNS (s. B. V. 4) gegen einzelsträngige DNS, die am 5'-Ende radioaktiv markiert worden war (s. B. IX. 1), hybridisiert (50,51).

Die Isolierung von radioaktiv markierter einzelsträngiger DNS erfolgte auf denaturierenden Harnstoff-Acrylamidgelen, wie von Maniatis et al. (38) beschrieben. Voraussetzung war, daß die zu trennenden DNS-Einzelstränge unterschiedliche Länge aufwiesen. Die elektrophoretische Auftrennung eines DNS-Fragments von ca. 200 bp Länge erfolgte mit dem unter B. IX. 3 beschriebenen Gelsystem (4 % Acrylamid) bei 20 V/cm Gellänge. Die Hybridisierung des DNS-Einzelstranges gegen poly (A)⁺-RNS (RNS von 100 ml exponentiell wachsender Hefekultur) erfolgte über Nacht bei 37°C in 30 µl Hybridisierungspuffer (40 mM Pipes pH 6,4 der Firma Sigma, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 80 % Formamid). Die einzelstrangspezifische Spaltung von nicht hybridisierter DNS und RNS erfolgte nach Zugabe von 10 Vol S1-Puffer (0,28 M NaCl, 0,05 M NaAc pH 4,6, 4,5 mM ZnSO₄, 20 µg/ml einzelsträngiger Träger-DNS) der Temperatur 4°C mit 600 Einheiten/ml S1-Nuclease (Boehringer) 45 Min. lang bei 30°C

XII. Klonierung des Allels supl-ts36 aus dem Hefestamm 7B-D244

Mit einem Ansatz ähnlich dem von Roeder und Fink (52) beschriebenen, wurde das Temperatursensitivität ver-

ursachende Allel *supl-ts36* nach der Integrations-Exzisionsmethode kloniert (53).

Der Hefestamm 7B-D244, der bei 37°C keinerlei Wachstum zeigt, wurde mit dem Plasmid pPBM10 (s. B. I. Tab 3b) transformiert. Da pPBM10 nicht in der Lage ist, sich in Hefe selbstständig zu replizieren, liegt es in den transformierten Zellen, die bei 37 °C wachsen in integrierter Form vor.

Nach der Präparation von chromosomaler DNS (s. B. V. 2) aus diesen temperaturresistenten Transformanten, dem Abbau der DNS mit zwei geeigneten Restriktionsendonukleasen und nachfolgender Ligation wurde *E. coli* c600 transformiert.

Da die Integration über homologe Rekombination in der Regel zu einer sogenannten Tandemanordnung der beiden Allele, den Vektor einschließend führt, enthalten die *E. coli* Rücktransformanten der mit Enzym A gespaltenen DNS das WT-Allel. Rücktransformanten der mit Enzym B gespaltenen DNS folglich das temperatursensitive Mutantenallel (s. C. VII.).

XIII. Isolierung von Ribosomen und Präparation von ribosomalen Untereinheiten aus Hefe

1 Isolierung ribosomaler Proteine aus Hefe

Die Hefestämme wurden in YPAD Vollmedium bei 27°C bis zu einer optischen Dichte (O.D.₅₄₆) von 2 geschüttelt. 15 Min. vor Ernte der Zellen wurde NaN_3 in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Dies bewirkt den Zerfall von Polysomen zu Monosomen.

Nach zweimaligem Waschen mit H_2O wurden die Zellen in 2 Vol Puffer I (100 mM Tris/Cl pH 7,4, 80 mM KCl, 12,5 mM MgAcetat und 1 mM DTT) pro Gramm Naßgewicht aufgenommen.

Die Zellen wurden durch zweimaliges Passieren durch eine French-Presszelle bei 20.000 psi aufgebrochen. Anschließend wurde das Zellhomogenisat zweimal bei 30.000 g abzentrifugiert, um Zellreste zu entfernen (Überstand = S30). Anschließend wurden die Ribosomen durch zweistündige Zentrifugation (50 Ti-Rotor, 40.000 rpm) aus dem S30 abgetrennt.

2. Präparation von ribosomalen Untereinheiten

80S Ribosomen, die wie oben beschrieben gewonnen worden waren, wurden in Puffer IV (20 mM Tris/Cl pH 7,4, 500 mM KCl, 5 mM MgAcetat und 1 mM DTT) suspendiert und über Nacht im Kühlraum gegen Puffer IV dialysiert. Durch eine abschließende Inkubation von 10 Min. bei 30°C wurde die vollständige Dissoziation in Untereinheiten erreicht. Die Auftrennung der Untereinheiten erfolgte durch Zentrifugation des Ansatzes durch einen 10 % - 30 % Saccharose-Gradienten (55 Min., 135.000 g, 10°C, Sorvall TV 850 Vertikalrotor). Der Gradient wurde anschließend mit dem Densi-Flow-Gerät von oben her entleert. Durch Aufzeichnen der Absorption bei 260 nm wurden die 40S- und die 60S-Untereinheiten der Ribosomen voneinander getrennt.

3 Extraktion von ribosomalen Proteinen

Die wie oben beschrieben gewonnenen ribosomalen Untereinheiten bzw. 80S Ribosomen wurden in einer Konzentration von 150 - 200 A₂₆₀ pro ml in TMSH (20 mM Tris, 10 mM MgAcetat, 5 mM Mercaptoäthanol, pH 7,5) resuspendiert. Anschließend wurden pro 1 ml Ribosomen 2 ml 66 % Essigsäure und 0,13 g Mg-Acetat zugegeben. Durch einstündiges heftiges Rühren bei 0°C mit einem Magnetrührer wurde die RNS ausgefällt und durch Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand, der die ribosomalen Proteine enthielt, wurde nacheinander für 4 h gegen 1 % Essigsäure bzw. 0,1 % Essigsäure dialysiert und dann lyophilisiert.

XIV. Gelelektrophorese von ribosomalen Proteinen

1 Eindimensionale Auftrennung

Die eindimensionale Auftrennung von ribosomalen Proteinen von Hefe erfolgte mit dem von Lämmli (54) beschriebenen Gelsystem mit 12,5 % Polyacrylamid in Gegenwart von SDS. Die Auftrennung erfolgte bei konstant 60 V über Nacht mit Bromphenolblau (0,1 %) als Anzeiger der Lauffront. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mit 0,2 % Coomassie Brilliant Blue R-250 in 30 % Methanol und 10 % Essig angefärbt.

2 Zweidimensionale Auftrennung

Die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen erfolgte mit dem Gelsystem nach Geyl et al. (55). Die Gelläufe wurden bei 4°C durchgeführt. Fuchsin diente als Anzeiger der Lauffront. Die Anfärbung der Proteine erfolgte wie für die eindimensionale Auftrennung beschrieben.

XV. In vitro-Translation von mRNA

1 Gewinnung der SUP1-spezifischen mRNA durch Hybridselektion

Diese Methode ermöglicht die Isolierung einer spezifischen mRNA aus der Gesamtheit der zellulären RNA von Hefe. Dabei wird denaturierte SUP1-spezifische DNA an Nitrozellulosefilter gebunden und gegen poly (A)⁺-RNA (s. B. V. 4) hybridisiert. Der Versuch wurde wie von Ricciardi et al. (56) bzw. Maniatis et al. (38) beschrieben durchgeführt.

2 Translation der mRNA in Retikulozytenlysat

Die SUP1-spezifische mRNA wurde in Retikulozytenlysat (Amerham N.90) eingesetzt, dessen endogene mRNA vom Hersteller wie von Pelham und Jackson (57) beschrieben mit Mikrokokkennuklease abgebaut worden war. Die Translation erfolgte nach Zugabe von radioaktiv markiertem L-(³⁵S) Methionin (Amersham SI.204). Die Analyse der Translationsprodukte erfolgte mit dem Gelsystem nach Lämmli (54). Die Ab-

messungen der Gele betrugen: 16,5 cm x 16,5 cm x 0,2 cm. Als Größenstandard (Firma Boehringer: 750115) wurden folgende Proteine verwendet: Phosphorylase b = 97,4 kd, Glutamat-DH = 55,4 kd, Lactat-DH = 36,5 kd, Trypsin-Inhibitor = 20,1 kd.

XVI. Computerprogramme

Die Analyse der DNS-Sequenzen erfolgte mit Hilfe des von Messing erhaltenen Programms (Version 2.1 und 3.0, (58)).

Dieses Programm diente dazu, Schnittstellen für Restriktionsenzyme aufzufinden, den DNS-Code in die Aminosäuresequenz zu übersetzen, sowie Homologien aufzufinden. Diese Arbeiten wurden an einem Apple II europlus Mikrocomputer in Pascal durchgeführt.

Am Rechenzentrum des Max Planck Instituts für Biochemie in Martinsried wurde die SUP1-Sequenz mit Hilfe der Programme Search (Version 3.2) und Wordsearch (Version 3.3) mit den Sequenzen einer Genbank verglichen. Dies erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Foertsch und Herrn Thierack.

XVII. Enzyme und besondere Chemikalien

Restriktionsendonukleasen, DNS-Polymerase I (Klenow Fragment), T4-DNS Ligase, Nuklease Bal 31, alkalische Phosphate aus Kälberdarm, unmarkierte dNTP's und synthetische DNS-"Linker" wurden von Boehringer Mannheim bezogen.

T4-Polynukleotidkinase entweder von Phamacia (Freiburg) oder von Boehringer Mannheim.

(γ - ^{32}P) ATP (7000 Ci/mMol) und (α - ^{32}P)-dNTP's stammten von New England Nuclear (Dreieich).

Bezugsquellen der Antibiotika: Ampicillin von Sigma, Tetracyclin von Boehringer Mannheim, Chloramphenicol und Kanamycin von Serva.

Alle anderen Feinchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad.

C. ERGEBNISSE

Das Wildtypallel des SUP1-Gens von Hefe wurde, wie bereits in einer früheren Arbeit beschrieben (31), von W. Piepersberg und A. Surguchov auf einem DNS-Fragment der Länge 6,3 kb aus einer p3030-Hefegenombank (s. B. II. 2) isoliert.

Zum besseren Verständnis meiner eigenen Versuche soll die Klonierung des SUP1 Allels einleitend kurz beschrieben werden.

Die DNS von 2800 Kolonien des Stammes E. coli c600, aufgeteilt in 18 "pools", welche mit p3030-Cosmiden mit inserierter Hefe-DNS, verpackt in Partikel des Phagen λ transduziert worden waren, wurden isoliert und in Hefezellen des Rezipientenstammes 7B-D244 (s. B. I. Tab. 2) transformiert. Aus der Transformation mit einer dieser DNS-Fraktionen gingen Kolonien hervor, deren Mutantentyp (Temperatursensitivität, Suppression von adel-14 und Hypersensitivität gegenüber Paromomycin) durch die komplementierende Wirkung des eingeschleusten dominanten SUP1-WT Allels aufgehoben wurde.

Aus E. coli-Rücktransformanten mit der DNS, die aus diesen Hefeklonen isoliert worden war, wurde pYsupl-1 (s. Abb. 1) als größtes Plasmid isoliert. Nur dieses 16,6 kb große Plasmid konnte alle pleiotropen Effekte des sup1-ts36 Allels komplementieren.

I. Charakterisierung des Plasmids pYsupl-1

1 Physikalische Kartierung und Subklonierung von Plasmid pYsupl-1

Die genaue Lokalisierung der Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen hatte zwei Ziele: Primär sollten die Grenzen von Restriktionsfragmenten bestimmt werden, die für die Subklonierung und anschließende Komplementationsanalyse geeignet schienen. Darüberhinaus wurden auch die Schnittstellen von Enzymen bestimmt, die zur Sequenzierung des komplementierenden Bereiches verwendet werden konnten.

Abb. 1 zeigt die relevante Restriktionskarte des Plasmids pYsupl-1 in und in der Umgebung des 6,3 kb grossen Fragments. Die Enzyme PstI, PvuI, PvuII und KpnI zeigten keine Spaltaktivität in der inserierten Hefe DNS.

Während der Untersuchungen stellte sich heraus, daß nach der Hefetransformation in Stamm 7B-D244 neben der direkten Selektion auf Temperaturresistenz auch direkt auf Paromomycinresistenz gegenüber 1,0 mg/ml dieses Antibiotikums selektiert werden konnte (Aufhebung der Hypersensitivität

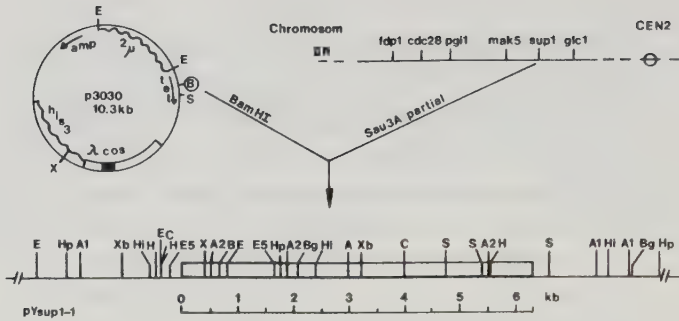


Abbildung 1:

Klonierungsstrategie des SUP1-WT Allels als 6,3 kb Restriktionsfragment, das nach Partialabbau mit der Restriktionsendonuklease Sau 3A in die BamHI-Schnittstelle des Cosmids p3030 kloniert wurde. Der untere Teil der Abbildung zeigt einen Teil des Vektors p3030. Das inserierte Fragment ist als Balken gezeichnet. Verwendete Symbole: amp = Ampicillin-Resistenzgen; tet = Tetracyclin-Resistenzgen; → = Richtung der Transkription; λ cos = kohäsive Enden des Phagen λ; 2μ = EcoRI-Restriktionsfragment des Plasmids 2μ, welches in Hefe autonome Replikation vermittelt; his3 = in Hefe selektierbares Gen der Histidinbiosynthese; CEN2 = Zentromerregion von Chromosom II; fdp1, cdc28, pgil, mak5, glc1 = Gene, die auf Chromosom IIR in der Nachbarschaft von sup1 liegen (59); A = AccI; A1 = AvaI; A2 = AvaII; B = BamHI; Bg = BglII; C = ClaI; E = EcoRI; E5 = EcoRV; H = HindIII; Hi = HincII; Hp = HpaI; S = SalI; X = XhoI; Xb = XbaI.

2 Test der von pYsup1-1 abgeleiteten Plasmide auf Komplementation der sup1-ts36 Mutation

Bei der Ermittlung des komplementierenden Abschnittes des klonierten 6,3 kb Fragments wurde so vorgegangen, daß die Eingrenzung zuerst von den Enden her erfolgte (s. Abb. 2; Subklone pPBM9 und pPBM4). Dann wurde das größte noch komplementierende zentrale Fragment ermittelt (pPBM6). Als kleinstes internes Fragment, das alle essentielle SUP1-Sequenzen enthielt, erwies sich das 1,8 kb BamHI/AccI-Fragment (pPBM44).

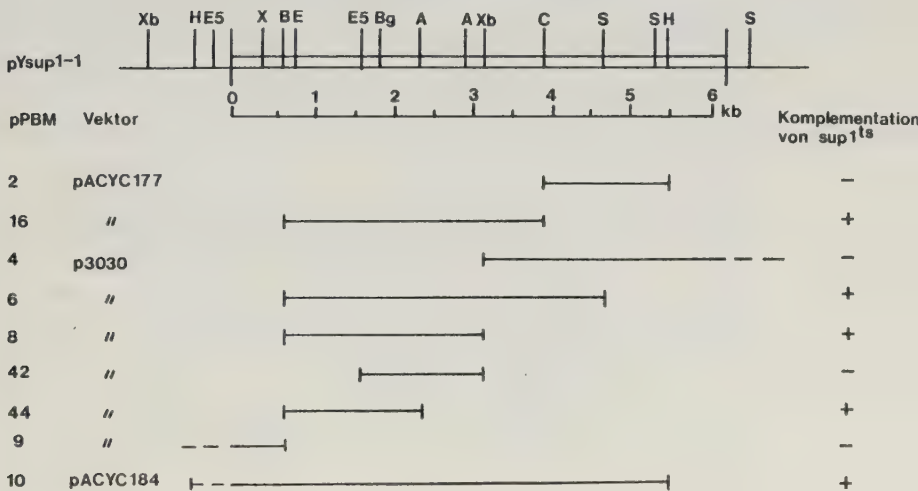


Abbildung 2:

Komplementation von sup1-ts36 mit verschiedenen Subfragmenten der in pYsup1-1 inserierten DNS. Nur die relevanten Teilfrag-

mente sind eingezeichnet. Alle pACYC177 bzw. pACYC184 Derivate können nicht in Hefe replizieren, sind also sogenannte Integrationsplasmide (yp). Die Konstruktion der einzelnen Subklone ist Tabelle 3b zu entnehmen.

Verwendete Symbole: A = AccI; B = BamHI; C = ClaI; E = EcoRI; E5 = EcoRV; H = HindIII; S = SalI; X = XhoI; Xb = XbaI.

II. Isolierung und Charakterisierung von weiteren supl-ts36 komplementierenden Plasmiden

Obwohl mit pYsupl-1 ein Plasmid isoliert worden war, das alle pleiotropen Effekte des supl-ts36 Allels komplementierte, blieben Fragen offen, die vor allem aus der Größe des inserierten DNS-Fragments resultierten.

Für ein ordnungsgemäß verpacktes Cosmid (Länge des klonierten Fragments 28 -40 kb) erwies es sich als zu klein. Die Länge des in pYsupl-1 klonierten Fragments von nur 6,3 kb könnte mit der beobachteten Instabilität von Plasmiden in Hefestamm 7B-D244 erklärt werden (Surguchov, persönliche Mitteilung). Dies bedeutete jedoch, daß dieses Plasmid möglicherweise ein Produkt rekombinativer Ereignisse war und daher eventuell kein kolinearer Abschnitt des Chromosoms II der Hefe.

Zur Klärung dieser Frage wurden aus einer anderen Koloniebank in Vektor YEpl3 (s. B. II. 1) Plasmide isoliert, deren klonierte DNS-Fragmente mit pYsupl-1 homolog waren.

Mit der unter B. X. 2 beschriebenen Methode der Koloniehybridisierung wurden 1196 Klone der YEpl3-Hefegenombank untersucht. Davon waren drei mit dem als Probe verwendeten 5,9 kb HindIII-Fragment von

pPBM10 (s. Abb. 2 und Tab. 3b) homolog. Die Grenzen der homologen Abschnitte wurden wie unter B. X. 3 beschrieben, durch DNS-DNS-Hybridisierung bestimmt.

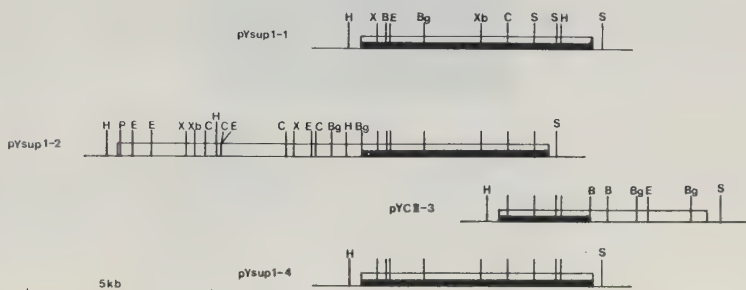


Abbildung 3:

Physikalische Karte der drei YEp13-Klone pYsup1-2, pYsup1-4 und pYCII-3 im Vergleich zu pYsup1-1.

Balken = klonierte Hefe DNS; fett ausgezogene Linie = zu pYsup1-1 homologer Bereich.

Verwendete Symbole der Restriktionsenzyme wie in Abb. 1

Die Abbildung 3 zeigt die Restriktionskarte von drei in YEp13 klonierten Genomsegmenten im Vergleich zur Insertion in pYsup1-1. Die durch Hybridisierung festgestellten internen Homologiebereiche bestätigten das Ergebnis der Restriktionsanalyse (s. Abb. 4).

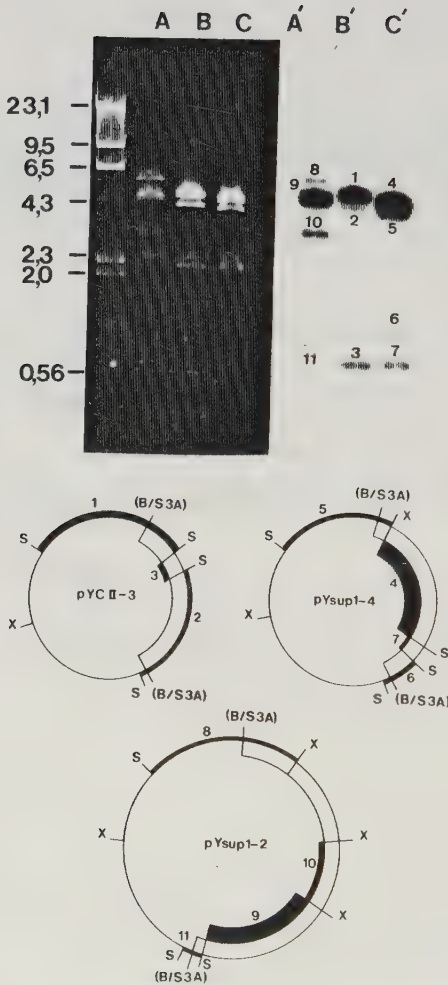


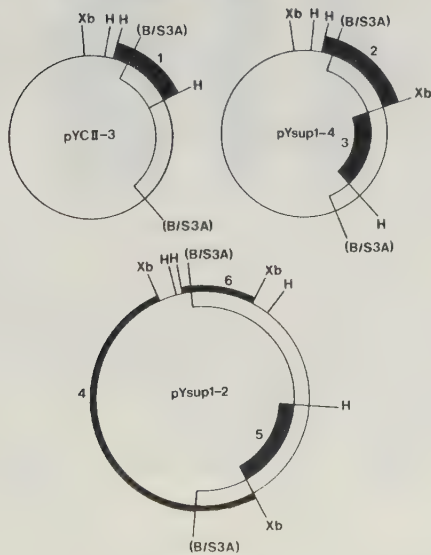
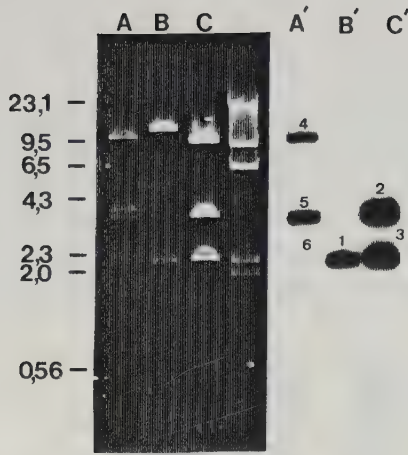
Abbildung 4:

Kreuzhybridisierung von pYsup1-1 und der 3 YEpl3 Klone.

a) oben: Auftrennung der YEpl3 Klone nach SalI/XhoI-Spaltung und Hybridisierung gegen radioaktiv markierte Proben-DNS aus pYsup1-1. A und A': pYsup1-2, B und B': pYCII-3, C und C': pYsup1-4.

unten: YEpl3-Klone mit den als schwarze Balken gezeichneten Fragmenten (1,2 .. 11), die mit pYsup1-1 homolog sind.

Verwendete Symbole: (B/S3A) = Insertgrenzen, S = SalI, X = XhoI



b) oben: YEp13-Klone nach HindIII/XbaI-Spaltung. Reihenfolge und Benennung der Klone wie in Teil a) der Abbildung.
 unten: YEp13-Klone mit den homologen Fragmenten (1,2 .. 6)
 Verwendete Symbole: (B/S3A) = Insertgrenzen, H = HindIII,
 Xb = XbaI.

Die physikalische Kartierung der drei YEpl3-Klone pYsupl-2, pYsupl-4 und pYCII-3, die im überlappenden Bereich untereinander und mit pYsupl-1 identische Muster zeigten, macht es wahrscheinlich, daß die Insertion in pYsupl-1 als kolineares Fragment des Chromosoms IIR von *S. cerevisiae* kloniert worden war.

Auch Komplementationstests mit den drei YEpl3-Klonen erbrachten das zu erwartende Ergebnis. Mit Ausnahme von pYCII-3 waren alle Klone in der Lage, das supl-ts36 Allel zu komplementieren.

III. Hybridisierung von Restriktionsfragmenten von Plasmid pYsupl-1 gegen Gesamt-DNS aus *S. cerevisiae* ("Genomischer Southern-blot")

Die unter C. II. beschriebenen Plasmide pYsupl-2, pYsupl-4 und pYCII-3 umfaßten einen Bereich von etwa 17,5 kb des rechten Arms von Hefechromosom II. Die drei Klone der YEpl3-Genombank und pYsupl-1 aus der p3030-Cosmidbank überlappten. DNS-DNS-Hybridisierungen zeigten die Homologie der inserierten DNS-Fragmente zueinander.

Den endgültigen Beweis der Kolinearität sowie der Identität des 6,3 kb-Inserts von pYsupl-1 als Fragment von Chromosom II erbrachte jedoch die Hybridisierung radioaktiv markierter Restriktionsfragmente von pYsupl-1 gegen Gesamt-DNS von Hefe. Die Präparation der Gesamt-DNS erfolgte wie unter B. V. 2 beschrieben aus dem Stamm S288C, dessen DNS auch zur Konstruktion der Cosmidgenombank verwendet worden war (B. Hohn, persönliche Mitteilung).

Die Auswertung des in Abb. 5 gezeigten Autoradio-
grammes ergab die erwarteten Größen der mit verschie-
denen Restriktionsendonukleasen abgebauten S288C-
Gesamt-DNS: BamHI: 5,7 kb; EcoRI: 7,3 kb; HindIII:
6,1 kb.

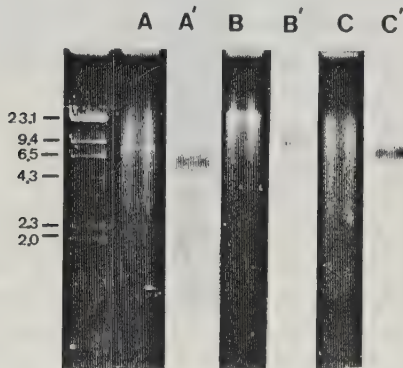


Abbildung 5:

"Genomischer Southern-blot" der Gesamt-DNS von Stamm S288C
gegen eine DNS Probe von pYsupl-1 (4,4 kb, 1,15 kb und
0,65 kb ClaI/SalI Restriktionsfragmente).

Die Hefe-DNS war mit folgenden Restriktionsenzymen gespal-
ten worden: A und A': HindIII, B und B': BamHI, C und C':
EcoRI. Die Größe der hybridisierenden Fragmente betrug:
6,1 kb (HindIII), 5,7 kb (BamHI) und 7,3 kb (EcoRI).
(s. Abb. 3)

IV. Hybridisierung von DNS des Plasmids pYsupl-1 gegen die DNS verschiedener Organismen

Zur Klärung der Frage, ob das SUP1-Gen der Hefe auf DNS Ebene mit Genen anderer Organismen homolog ist, wurde DNS des Plasmids pYsupl-1 gegen die mit verschiedenen Restriktionsenzymen (EcoRI und BamHI) gespaltene Gesamt-DNS folgender Organismen hybridisiert: *Methanococcus vanniellii* (DSM1224); *E. coli* (60) Maus (Klon c57 black 6, Milz); Weizenkeimlinge; Mensch (Plazenta) und *S. cerevisiae* S288C (als Kontrolle).

Selbst bei wenig stringenten Bedingungen (Waschen der Nitrozellulosefilter bei 4°C) waren keine spezifischen Banden nachweisbar, die eine Homologie auf DNS-Ebene zu anderen Organismen belegt hätten.

V. Hybridisierung von DNS des Plasmids pYsupl-1 gegen RNS aus Hefe

Um die Zahl und ungefähre Größe von Transkripten auf dem klonierten *supl-ts36* komplementierenden DNS-Fragment nachzuweisen, wurde eine sogenannte "Northern"-Hybridisierung durchgeführt.

Die RNS der Hefestämme DBY747, 7B-D244 und *rna2-1* wurde gegen das 1,45 kb große BamHI/BglII-Fragment hybridisiert. Die Hybridisierung gegen RNS des "splicing-defekten" Stammes *rna2-1*, der bei 37°C primäre Transkripte nicht prozessieren kann, wurde zum Nachweis eventuell vorhandener intervenierender Sequenzen (Introns) in den Transkripten mit untersucht.

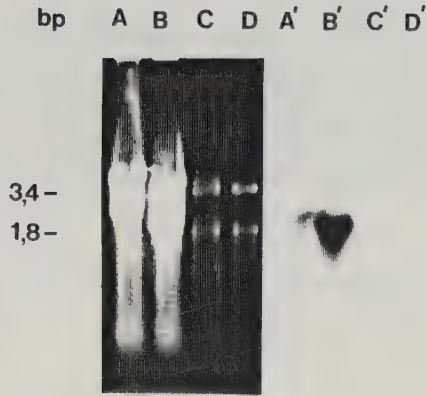


Abbildung 7:

"Northern"-Hybridisierung der RNS von Hefe gegen radioaktiv markierte, SUP1-spezifische DNS-Probe (1,45 kb BamHI/BglII-Insert von pPBM102). In den einzelnen Spuren wurde aufgetragen:
A und A': rna2-1 (Gesamt-RNS); B und B': 7B-D244 (Gesamt-RNS);
C und C': 7B-D244 (poly (A)⁺-RNS); D und D': DBY747 (poly (A)⁺-RNS)

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der "Northern"-Hybridisierung mit Gesamt-RNS der Stämme rna2-1 und 7B-D244 bzw. poly (A)⁺-angereicherte RNS (s. B. V. 4) der Stämme 7B-D244 und DBY747. In allen RNS-Präparationen ließ sich nur eine einzige hybridisierende Bande gleicher Wanderungsgeschwindigkeit nachweisen. Die etwas nach oben versetzten Signale bei der Auftrennung von Gesamt-RNS resultierten aus der Überladung dieser Spuren. Anhand des internen Größenstandards, gegeben durch die rRNS-Spezies (18S rRNS: 1,8 kb (61) und 25S rRNS: 3,4 kb (62)), wurde das wahrscheinlich von Genort SUP1 abgelesene Transkript

mit einer Länge von etwa 1,6 kb bestimmt. Da das Transkript des "splicing-defekten" Stammes rna2-1 gleich groß war, wie das von Stamm 7B-D244, war das Vorkommen von Introns ausgeschlossen. Dieses Ergebnis bestätigt die Befunde von Himmelfarb et al. (63).

VI. In vitro-Translation des hybridselektierten SUP1-Transkripts mit Retikulozytenlysat

Um das Translationsprodukt des im "Northern"-Experiment (s. Abb. 7) hybridisierenden SUP1-spezifischen Transkripts nachzuweisen, wurde die Methode der in vitro-Translation hybridselektierter mRNS angewendet.

Im Unterschied zum "Northern-blot" werden bei der Hybridselektion spezifischer Transkripte, die in vitro translatiert werden sollen, die DNS-Einzelstränge an Nitrozellulose angebunden. Die mRNS Moleküle binden komplementär an die codogenen DNS-Einzelstränge und werden nach Abwaschen von unspezifisch gebundener RNS eluiert.

Die Durchführung der in vitro-Translation erfolgte mit einem Retikulozytenlysat (Kaninchen, N.90) der Firma Amersham.

Die gelelektrophoretische Analyse der in vitro-Translation, wie in Abbildung 8 dargestellt, zeigte einen verstärkten Einbau von Radioaktivität in ein etwa 50 kd großes Polypeptid. Für die auch im "background" der mRNS-freien Kontrolle stets auftretende schwache Markierung an entsprechender Stelle auf den SDS-Gelen konnte gezeigt werden, daß diese bei vergleichen-

der Auftrennung der Translationsansätze ohne vorheriges Aufkochen in Auftragspuffer nicht mehr an gleicher Position wie das 50 kd Polypeptid der Ansätze mit mRNS lief und möglicherweise das Produkt der unspezifischen Markierung einer Komponente des in vitro Systems war.

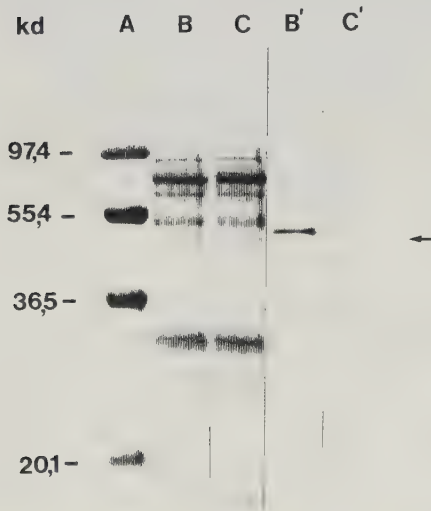


Abbildung 8:

In vitro-Translation der hybridselektierten SUP1-spezifischen mRNS. Die Auftrennung erfolgte mit dem Gelsystem von Lämmli (54), wie unter B. XV. 2 beschrieben.

A: Markerproteine (s. B. XV. 2); B und B': Ansatz mit poly (A)⁺ - RNS; C und C': Kontrolle ohne RNS; Pfeil: 50 kd Translationsprodukt.

VII. Klonierung des sup1-ts36 Allels aus Hefe

Die Klonierung des sup1-ts36 Allels der Hefe erfolgte nach der von Röder und Fink (52) bzw. Cummings und Culbertson (53) beschriebenen Methode.

Die Durchführung des Experiments nach dieser Integrations-Exzisionsmethode erfolgte wie in Abbildung 9 dargestellt.

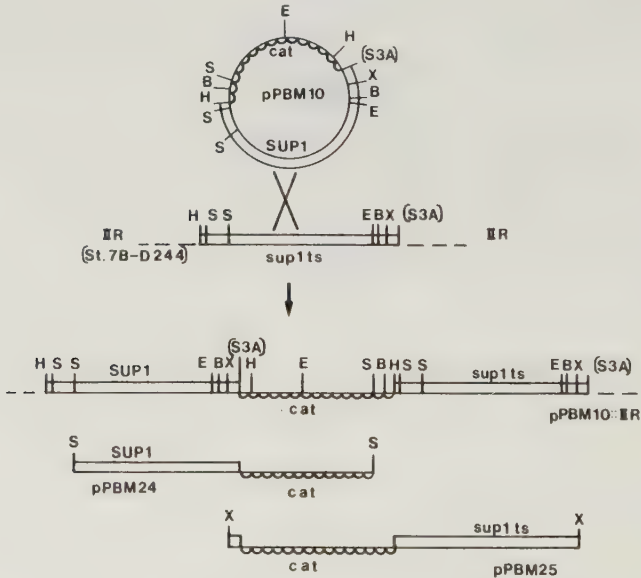


Abbildung 9:

Klonierung des sup1-ts36 Allels durch Integration/Exzision.

Das in Hefe nicht autonom replizierbare Plasmid pPBM 10 wurde nach Transformation in Stamm 7B-D244 in Chromosom II integriert (oben). Dabei entstand ein Cointegrat (pPBM10: IIR)

Balken = klonierte Hefe-DNS; Wellenlinie = Vektor pACYC184. Verwendete Symbole: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; (S3A) = Sau3A; S = SalI; X = XhoI; cat = Gen der Chloramphenicol-Acetyltransferase; SUP1 = WT-Allel; sup1ts = Mutantenallel.

Hefestamm 7B-D244 (sup1-ts36) wurde mit dem Integrationsplasmid pPBM10 transformiert und auf Temperaturresistenz selektiert. Zur Exzision aus der Gesamt-DNS temperaturresistenter Transformanden wurden zwei Restriktionsenzyme (SalI und XhoI) so gewählt, daß nach Rezirkularisierung zwei Typen von Plasmiden entstanden, die jeweils entweder den links oder den rechts des inserierten Vektorplas- mids (pACYC184) benachbarten Abschnitt der Hefe- DNS enthielten. Die so erzeugten Plasmide pPBM24 und pPBM25 erwiesen sich als komplementär in Bezug auf den Alleltyp des SUP1-Gens: Ein Komplementationstest erfolgte nach Klonierung der jeweiligen 4,1 kb BamHI/SalI-Fragmente in den Schaukel- vektor pJ030. Dies führte zu den beiden Plasmiden pPBM26 (4,1 kb-Fragment aus pPBM24) und pPBM27 (4,1 kb-Fragment aus pPBM25). Nach Transformation in *S. cerevisiae* Stamm 7B-D244 zeigte sich, daß pPBM26 das Wildtypallel und pPBM27 das Mutanten- allel trug.

VIII. Nukleotidsequenz des SUP1-Gens und des supl-ts36 Allels

Zur weiteren Charakterisierung des SUP1-Genprodukts sowie der supl-ts36 Mutation wurden die Nukleotidsequenzen beider Allele ermittelt.

1 Strategie der Sequenzierung

Die unter C. I. 2 beschriebenen Komplementationsanalysen (s. Abb. 2) legten nahe, daß das 1,8 kb AccI/BamHI-Fragment des Plasmids pYsupl-1 ein intaktes, in trans funktionelles Strukturgen codierte. Dieses AccI/BamHI-Fragment wurde daher zunächst sequenziert. Die DNS-Primärstruktur angrenzender Bereiche wurde später ebenfalls bestimmt.

Die verwendete Sequenzierungsmethode (Maxam/Gilbert) erforderte eine möglichst gleichmäßige Anordnung verfügbarer Restriktionsschnittstellen mit einfach zu markierenden Enden. Daher wurde eine Reihe von Deletionsprodukten mit Hilfe der Exonuklease Bal31, ausgehend von der einzigen BglII-Erkennungsstelle des Plasmids pPBM102 (s. Tab. 3b) unter Einfügung einer neuen HindIII-Schnittstelle, hergestellt. Von diesen singulären HindIII-Schnittstellen aus, die sich bei den einzelnen Bal31-Derivaten an unterschiedlicher Position zwischen den Schnittstellen BamHI und XbaI befanden, war es nun möglich, den oben angesprochenen Abschnitt vollständig und überlappend zu sequenzieren.

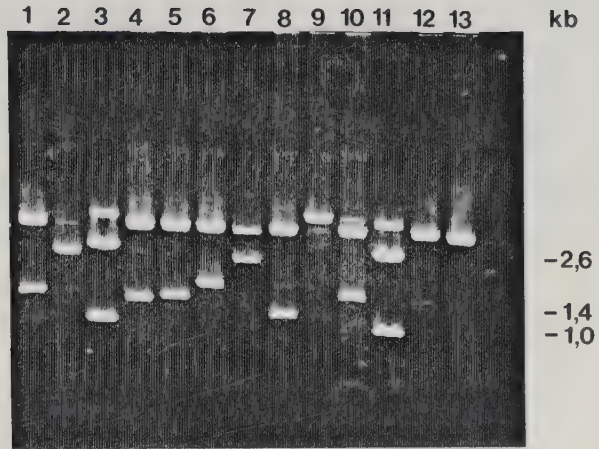


Abbildung 10:

Mit *Bal31* verkürzte Derivate von Plasmid pPBM102.

In den Spuren 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 und 13 wurde die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xba*I gesplattene Plasmid-DNS folgender *Bal31*-Klone aufgetrennt: pPBM102 - 136, -137, -138, -139, -140, -142, -143, -144, -145 und -146.

Spur 3: pPBR322 (*Sal*I/*Pvu*I); Spur 7: pPBM102 (*Bam*HI/*Xba*I);

Spur 11: pPBR322 (*Bam*HI/*Pvu*II).

Bei der Sequenzierung des Allels *sup1-ts36* konnte auf die Konstruktion von *Bal31*-Derivaten verzichtet werden, da aus der vorher ermittelten Wildtypsequenz auch die genaue Position der Schnittstellen von Restriktionsenzymen mit einer 4 bp langen Erkennungssequenz (*Hpa*II) bekannt waren, die sich zur Sequenzierung eigneten.

In Abbildung 11 ist die Strategie der Sequenzierung beider Allele des *SUP1*-Gens dargestellt.

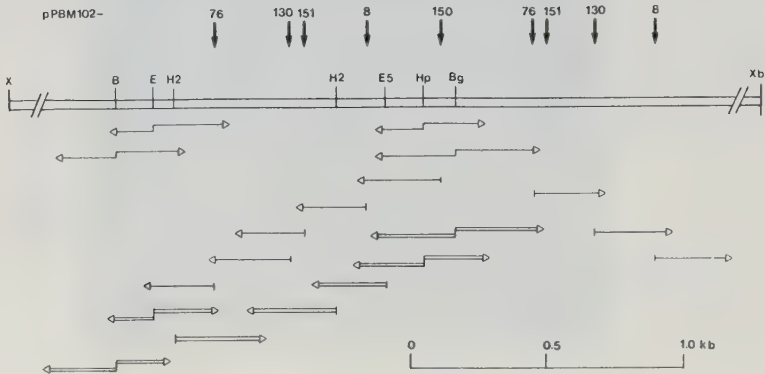


Abbildung 11:

Sequenzierungsstrategie der beiden SUP1-Allele.

Der Balken entspricht dem XhoI/XbaI-Fragment von Plasmid pYsup1-1, pPBM102-76, -130 usw.: Position des inserierten HindIII-"Linkers" in den einzelnen Bal31-Derivaten.

Verwendete Symbole: B = BamHI; Bg = BglII; E = EcoRI; E5 = EcoRV; H2 = HpaII; einfache Pfeile = Sequenzierung des WT-Allels; doppelte Pfeile = Sequenzierung des Mutantenallels.

2. Sequenzanalyse

Die Analyse der DNS-Sequenz des SUP1-Gens erfolgte mit Hilfe von Computerprogrammen (s. B. XVI.) Die Abbildung 12 zeigt als Ergebnis der Computeranalyse einen 1311 Basenpaare langen offenen Lese-rahmen, der für ein aus 437 Aminosäuren aufgebau-

tes Protein codiert. Das Molekulargewicht des SUP1-Proteins, das sich hieraus errechnen ließ beträgt etwa 49 kd und stimmt mit dem Molekulargewicht von ca. 50 kd, das bei der in vitro-Translation (s. Abb. 8) ermittelt wurde, gut überein. Der offene Leserahmen war durchgehend und Anzeichen, die auf intervenierende Sequenzen im SUP1-Gen hindeuteten fanden sich nicht. Insbesondere fehlte die Consensussequenz TACTAAC (64), die innerhalb aller bisher beschriebenen Introns in *S. cerevisiae* im Abstand von -16 bis -64 Nukleotiden oberhalb der 3' "splice"-Stelle gefunden wurde und stets vollständig konserviert war. Dieses Ergebnis stimmte mit den Resultaten der "Northern-blot"-Analyse überein (s. Abb. 7). Hier war die Länge des Transkripts von Stamm 7B-D244 vergleichend mit dem Transkript des "splicing"-defekten Stammes rna2-1 bestimmt worden. Bei beiden Stämmen lag die "Northern"-Bande an gleicher Position des Radiogramms. Die Länge beider Transkripte betrug ca. 1,6 kb und enthielt daher genügend Informationskapazität für ein Genprodukt der postulierten Grösse. Die Abbildung 12 zeigt ebenfalls die ermittelten Abweichungen in der Sequenz des aus Stamm 7B-D244 isolierten *sup1-ts36* Allels. Innerhalb des 1311 Basenpaare langen offenen Leserahmens wurden 6 Nukleotidaustausche nachgewiesen. Mit Ausnahme der Transversion von G zu T in Position 519 waren alle Austausche Transitionen. Dies gilt auch für die vier Austausche, die in den 5'- bzw. 3'-angrenzenden Bereichen nachgewiesen wurde. Lediglich die Transition von T zu C in Position 101 führte zum

Austausch der Aminosäure Leucin gegen Serin. Die anderen 5 Nukleotidaustausche innerhalb des offenen Leserahmens fanden alle in der dritten Position der betreffenden Codons ("wobble"-Position) statt und führten zu keinem Aminosäureaustausch (65). In diesem Zusammenhang muß berücksichtigt werden, daß das supl-ts36 Allel aus 7B-D244 stammte, während das WT-Allel aus S288C isoliert wurde. Die Verwandtschaft beider Stammlinien zueinander war nicht mehr zu klären. Zwei weitere Veränderungen, die durch die vergleichende Sequenzierung entdeckt wurden, erfolgten im 5'- angrenzenden Bereich zwischen Position -158 und -235 bezogen auf das WT-Allel, wo die Anzahl aufeinander folgender T-Reste an zwei Stellen in den beiden Allelen voneinander abwich.

-987

ACTTGTGTAGCTCTATTCTCTTTCACAC

-957

CACCTTTTCTTTATTCCAAAATTTTAAACCTTTATGTTACATTATATAATCTTCTGTCTGAAATGTTTGGATATAACGCTCTT

-870

GATCCACTTTGTATATGGTGCTATTTATTTTCAGATTTATAAAGAGTATAAGCGTCATTTACATAAATAGCTGAAGTTATTCATGG

-783

AAAATACGAAGAGCAAGTATGTGAGCCAAACAGAACATTTGACGTAAAGCTCTACAATGTGCCAAGAACTGGACAAGTAGAGGACTGA

-696

GAACCTTTATTTCAATTCATTGCTCCTTTTGGTTGGCTACCTTTAGCGAAGGTCAATGATGAATGTCACATGCTGTGGAACCAA

-609

AAGCAAAATCTAACCAACTTCAAAATGACATAGTCATCTGATATTTCTACTCATTATAGATAGTATGGGAGCCTTGAAACGAAAAGT

-522

AAGTAAAAAGCTGGATATGACGAGTATGAGGTAGACCTTAGCTACATCATTTCCGCCAATAGCTGCTGCAAAATATCTGGTTAAATTT

-435

GTGATTCCATGAAGAGGATAACAGACTTGTAAAAAGCATCCTGTCAAAATCTAATTTTTGAAGGCGAGTATTCATTCATAATTTA

-348
CTTCAGCTTAGACTCCTCCAAATTTATGGTATTATAACCTGATCATAACTACAATCTGTCCCTACCGCATGTACGAAGAATACTTAA

-261
GTCACCTTGCCTCTCATCATTTGGTACATTTTTCAGTAATACCGTTTGAATGGCGCGTCTTTATTACCGGATTATTCGGTTGACDCT

-174 +T
GAATGAAAAATTTTTCAGAAATCCAGTGCCTAAGCGTCAAAATCAATGAAATACATCACTGTATTTTAACTGATATACTGTTGGTGT

-87 A
GGCCTTAAGACACDCTTTATTTCTTAATTCATTTTGGCTTGTCTCCTTATTAAAGACTACAGAAATAGACAAAGGAAATACTTCAATA

BglII 66
ATG GAT AAC GAG GTT GAA AAA AAT ATT GAG ATC TGG AAG GTC AAG AAG TTG GTC CAA TCT TTA GAA
MET Asp Asn Glu Val Glu Lys Asn Ile Glu Ile Trp Lys Val Lys Lys Leu Val Gln Ser Leu Glu

G C 132
AAA GCT ACA GGT AAT GGT ACT TCT ATG ATT TCC TTA GTT ATT CCT CCT AAG GGT CTA ATT CCA CTG
Lys Ala Arg Gly Asn Gly Thr Ser Met Ile Ser Leu Val Ile Pro Pro Lys Gly Leu Ile Pro Leu
23 Ser

HpaI 198
TAC CAA AAA ATG TTA ACA GAT GAA TAT GGT ACT GGC TCG AAT ATT AAA TCT AGG GTT AAT CGT CTT
Tyr Gln Lys Met Leu Thr Asp Glu Tyr Gly Thr Ala Ser Asn Ile Lys Ser Arg Val Asn Arg Leu
45

264
TCC GTT TTA TCT GCT ATC ACT TCC ACC CAA CAA AAG TTG AAG CTA TAT AAT ACT TTG CCC AAG AAC
Ser Val Leu Ser Ala Ile Thr Ser Thr Gln Gln Lys Leu Lys Leu Tyr Asn Thr Leu Pro Lys Asn
67

EcoRV 330
GGT TTA GTT TTA TAT TGT GGT GAT ATC ACT ACT GAA GAT GGT AAA GAA AAA AAG GTC ACT TTT GAC
Gly Leu Val Leu Tyr Cys Gly Asp Ile Ile Thr Glu Asp Gly Lys Glu Lys Lys Val Thr Phe Asp
89

396
ATC GAA CCT TAC AAA CCT ATC AAC ACA TCC TTA TAT TTG TGT GAT AAC AAA TTT CAT ACA GAA GTT
Ile Glu Pro Tyr Lys Pro Ile Asn Thr Ser Leu Tyr Leu Cys Asp Asn Lys Phe His Thr Glu Val
111

462
CTT TCG GAA TTG CTT CAA GCT GAC GAC AAG TTC GGT TTT ATA GTC ATG GAC GGT CAA GGT ACT TTG
Leu Ser Glu Leu Leu Gln Ala Asp Asp Lys Phe Gly Phe Ile Val Met Asp Gly Gln Gly Thr Leu
133

T 528
TTT GGT TCT GTG TCC GGT AAT ACG AGA ACT GTT TTA CAT AAA TTT ACT GTC GAT CTG CCA AAA AAG
Phe Gly Ser Val Ser Gly Asn Thr Arg Thr Val Leu His Lys Phe Thr Val Asp Leu Pro Lys Lys
155

594
CAT GGT ACA GGT GGT CAA TCT GCG CTT CGT TTT CCT CGT TTA AGA GAA GAA AAA AGA CAT AAT TAT
His Gly Arg Gly Gly Gln Ser Ala Leu Arg Phe Ala Arg Leu Arg Glu Glu Lys Arg His Asn Tyr
177

660
GTG AGA AAG GTC GGC GAA GTT GCT GTT CAA AAT TTT ATT ACT AAT GAC AAA GTC AAT GTT AAG GGT
Val Arg Lys Val Ala Glu Val Ala Val Gln Asn Phe Ile Thr Asn Asp Lys Val Asn Val Lys Gly
199

C

TTA ATT TTA GCT GGT TCT GCT GAC TTT AAG ACC GAT TTG GCT AAA TCT GAA TTA TTC GAT CCA AGA
Leu Ile Leu Ala Gly Ser Ala Asp Phe Lys Thr Asp Leu Ala Lys Ser Glu Leu Phe Asp Pro Arg
221

726

CTA GCA TGT AAG GTT ATT TCC ATC GTG GAT GTT TCT TAT GGT GGT GAA AAC GGT TTC AAC CAG GCT
Ile Ala Cys Lys Val Ile Ser Ile Val Asp Val Ser Tyr Gly Gly Glu Asn Gly Phe Asn Gln Ala
243

792

ATC GAA CTT TCT GGC GAA GCG TTG GGC AAT GTC AAG TAT GTT CAA GAA AAG AAA TTA TTG GAG GCA
Ile Glu Leu Ser Ala Glu Ala Leu Ala Asn Val Lys Tyr Val Gln Glu Lys Lys Leu Leu Glu Ala
265

858

TAT TTT GAC GAA ATT TCC CAG GAC ACT GGT AAA TTC TGT TAT GGT ATA GAT GAT ACT TTA AAG GCA
Tyr Phe Asp Glu Ile Ser Gln Asp Thr Gly Lys Phe Cys Tyr Gly Ile Asp Asp Thr Leu Lys Ala
297

924

A

TTG GAT TTA GGT GCA GTC GAA AAA TTA ATT GTT TTC GAA AAT TTG GAA ACT ATC AGA TAT ACA TTT
Leu Asp Leu Gly Ala Val Glu Lys Leu Ile Val Phe Glu Asn Leu Glu Thr Ile Arg Thy Thr Phe
319

990

C

AAA GAT GGC GAG GAT AAT GAG GTT ATA AAA TTC GCT GAA CCA GAA GGC AAG GAC AAG TCG TTT GCT
Lys Asp Ala Glu Asp Asn Glu Val Ile Lys Phe Ala Glu Pro Glu Ala Lys Asp Lys Ser Phe Ala
341

1056

ATT GAC AAA GCT ACC GGC CAA GAA ATG GAC GTT GTC TCC GAA GAA CCT TTA ATT GAA TGG CTA GCA
Ile Asp Lys Ala Thr Gly Gln Glu Met Asp Val Val Ser Glu Glu Pro Leu Ile Glu Trp Leu Ala
363

1122

EcoRI

GCT AAC TAC AAA AAC TTC GGT GCT ACC TTG GAA TTC ATC ACA GAC AAA TCT TCA GAA GGT GGC CAA
Ala Asn Tyr Lys Asn Phe Gly Ala Thr Leu Glu Phe Ile Thr Asp Lys Ser Ser Glu Gly Ala Gln
385

1188

TTT GTC ACA GGT TTT GGT GGT ATT GGT GGC ATG CTG CGT TAC AAA GTT AAT TTT GAA CAA CTA GTT
Phe Val Thr Gly Phe Gly Gly Ile Gly Ala Met Leu Arg Tyr Lys Val Asn Phe Glu Gln Leu Val
407

1254

BamHI

GAT GAA TCT GAG GAT GAA TAT TAT GAC GAA GAT GAA GCA TCC GAC TAT GAT TTC ATT TAAATAAAATA
Asp Glu Ser Glu Asp Glu Tyr Tyr Asp Glu Asp Glu Gly Ser Asp Tyr Asp Phe Ile
429

1322

A

AAAGGGGAGAGAAAAAATCGAATCAAAAAGATTATCACTAGATGCCAGATTAAAGTTAAATTCCTTTTAAATTTTTGTACAAT

1409

G

ATAATATATACTTGGTAAACCTTTTGTCTATATTGAGCTAATTCCTTTGTTGAAAGTACATAGTGGTTTACAGGACCGTGATAT

1496

A

TACGTAGAAAATACAGTGAAAGGAGAGTTTCTCTTCAAAAGCCTCGAGATTAATTATTTCTCTTTT

Abbildung 12:

DNS-Sequenz des SUP1-Gens (sowie der 5'- und 3'-angrenzenden Bereiche) und der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz (WT und sup1-ts36). Die hochgestellten Nukleotide stehen an den Positionen, wo die Sequenz des sup1-ts36 Allels von der WT-Sequenz abwich. Die einzige Aminosäure Serin (Position 34), die ausgetauscht wurde, steht unter der entsprechenden Aminosäure des WT.

Die Aminosäurezusammensetzung des möglichen SUP1-Proteins zeigte ein Überwiegen der sauren Aminosäurereste gegenüber den basischen, so daß ein Isoelektrischer Punkt im Sauren erwartet werden könnte.

Tabelle 4: Aminosäurezusammensetzung des SUP1-Proteins

Ala	29	Gly	31	Met	6	Ser	25
Cys	4	His	4	Asn	22	Thr	24
Asp	32	Ile	27	Pro	10	Val	32
Glu	39	Lys	41	Gln	15	Trp	2
Phe	23	Leu	41	Arg	13	Tyr	17

In Tabelle 5 ist die Codonverwendung im SUP1-Gen vergleichend mit einem ribosomalen Protein (L16) aufgelistet. Die genaue Analyse der Verwendung bestimmter Codons (s. Diskussion) im SUP1-Gen und im ribosomalen Protein L16 ergab, daß das Suppressorgen nicht zu den sehr stark expremierten Hefegenen gehört.

Tabelle 5: Benutzung der Codons im SUP1-Gen und im Gen des ribosomalen Proteins L16

SUP1 L16			SUP1 L16			SUP1 L16			SUP1 L16		
Phe TTT	14	0	Ser TCT	12	5	Tyr TAT	13	3	Cys TGT	4	1
Phe TTC	9	8	Ser TCC	9	4	Tyr TAC	4	2	Cys TGC	0	0
Leu TTA	17	3	Ser TCA	1	0	Stop TAA	1	1	Stop TGA	0	0
Leu TTG	12	7	Ser TCG	3	0	Stop TAG	0	0	Trp TGG	2	1
Leu CTT	5	0	Pro CCT	5	1	His CAT	4	0	Arg CGT	4	1
Leu CTC	0	1	Pro CCC	1	0	His CAC	0	3	Arg CGC	0	0
Leu CTA	4	0	Pro CCA	4	4	Gln CAA	13	6	Arg CGA	0	0
Leu CTG	3	0	Pro CCG	0	1	Gln CAG	2	0	Arg CGG	0	0
Ile ATT	14	5	Thr ACT	13	7	Asn AAT	14	0	Ser AGT	0	0
Ile ATC	10	5	Thr ACC	4	4	Asn AAC	8	7	Ser AGC	0	0
Ile ATA	3	0	Thr ACA	6	1	Lys AAA	22	4	Arg AGA	8	15
Met ATG	6	4	Thr ACG	1	0	Lys AAG	19	13	Arg AGG	1	0
Val GTT	18	6	Ala GCT	14	4	Asp GAT	18	4	Gly GGT	29	15
Val GTC	11	8	Ala GCC	8	3	Asp GAC	14	7	Gly GGC	1	0
Val GTA	0	0	Ala GCA	5	0	Glu GAA	33	9	Gly GGA	1	0
Val GTG	3	1	Ala GCG	2	0	Glu GAG	6	1	Gly GGG	0	0

Gesamtzahl der benutzten Codons: SUP1 = 438; L16 = 174

IX. Lokalisation der sup1-ts36 Mutation durch Fragmentaustausch

Um schlüssig nachzuweisen, daß nur die Transition von T zu C in Position 101 der SUP1 Nukleotidsequenz (s. Abb. 12) die beobachtete Veränderung des SUP1 Phänotyps

verursachte, wurden durch Fragmentaustausch zwei Hybridgene konstruiert. Die Abbildung 13 skizziert das Vorgehen.

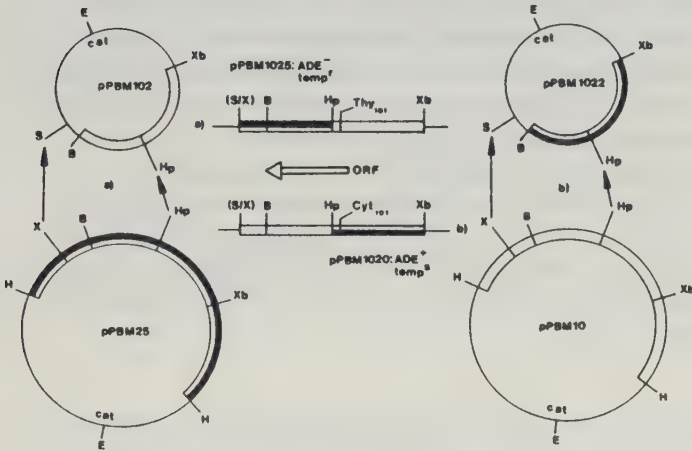


Abbildung 13:

Konstruktion von SUP1/sup1-ts36 Hybridgenen.

Die SalI/HpaI Fragmente der Plasmide pPBM102 bzw. pPBM1022 wurden durch die XhoI/HpaI Fragmente der Plasmide pPBM25 bzw. pPBM10 ausgetauscht. Dies führte zu den Konstrukten pPBM1025 (a) und pPBM1020 (b). Die Komplementationanalyse nach Trans-formation in Stamm 7B-D244 wurde nach Klonieren der BamHI/XbaI Fragmente (2,65 kb) in BamHI/XbaI von Vektor p3030 (analog zur Konstruktion von pPBM8, s. Tab. 3b) durchgeführt.

Offene Balken entsprechen Wildtypsegmenten, halb ausgefüllte Balken entsprechen Mutantensegmenten, der Pfeil zwischen den Plasmiden pPBM1025 und pPBM1020 zeigt die Länge und Richtung des offenen Leserahmens an. Verwendete Symbole: B = BamHI; E = EcoRI; H = HindIII; Hp = HpaI; S = SalI; X = XhoI; Xb = XbaI; (S/X) = XhoI ligiert mit SalI; Thy = Thymin; Cyt = Cytosin; Cat = Chloramphenicol-Resistenzgen

Die Komplementationstests, die nach Klonieren der 2,65 kb BamHI/XbaI-Fragmente der Plasmide pPBM1025 und pPBM1020 in den Schaukelvektor p3030 mittels Transformation in 7B-D244 durchgeführt wurden, zeigten eindeutig, daß nur der Aminosäureaustausch von Leucin zu Serin in Position 34 des SUP1 Proteins die Suppressoreigenschaften verursachte. Zur Kontrolle wurden die Nukleotidsequenzen der beiden Hybridplasmide pPBM1025 und pPBM1020 durch Sequenzierung von der EcoRI-Schnittstelle aus (in Richtung HpaI-Schnittstelle) und von der BglII-Schnittstelle aus (in Richtung HpaI-Schnittstelle) bestimmt. In Plasmid pPBM1020 war an Position 1008 ein T und an Position 101 ein C. Plasmid pPBM1025 besaß in Position 1008 ein T und in Position 101 ebenfalls ein T.

X. S1-Kartierung des Startpunkts der Transkription der SUP1-mRNS

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, folgen auf das postulierte Startcodon weitere ATG-Tripletts im gleichen Leserahmen. Die Festlegung des N-Terminus des SUP1-Proteins, wie er in Abb. 12 dargestellt ist, beruht auf den Ergebnissen der S1-Kartierung des Transkriptionsstarts.

Mit dem Anfangs verwendeten EcoRV/AccI-Restriktionsfragment (Position +286 bis -492), dessen gerade Enden erzeugende EcoRV-Schnittstelle radioaktiv markiert worden war, ließ sich kein vor S1-Nuklease-

abbau geschützten DNS-RNS-Hybrid nachweisen. Die Erklärung hierfür ist möglicherweise die geringe Effizienz, mit der nichtkohäsive Enden mit T4-Poly-nukleotidkinase radioaktiv markiert werden. Das besser markierbare TaqI/HaeIII-Fragment erbrachte ebenfalls kein Ergebnis, wenn es als Doppelstrang in die Hybridisierung eingesetzt wurde. Die in diesen Experimenten verwendeten Hybridisierungstemperaturen bei verschiedenen Ansätzen lagen um 1°C bzw. 2°C über der Schmelztemperatur des DNS-Doppelstrangs (44,3°C), die nach folgender Formel ermittelt worden war (66):

$$T_m = 81,5 + 0,5 (\% G + C) + 16,6 \log (Na^+) - 0,6 (\% \text{ Formamid})$$

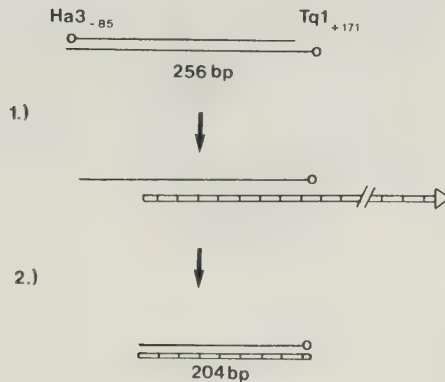


Abbildung 14a:

S1-Kartierung des 5'-Endes der SUP1-mRNA

Das TaqI/HaeIII-Fragment wurde nach radioaktiver Markierung der 5'-Enden (Kreise) in Einzelstränge getrennt. Der längere Einzelstrang (Markierung am TaqI-Ende) wurde gegen poly (A)⁺-RNS (unterbrochener Balken mit Pfeil) hybridisiert = 1.) Das 204 bp lange DNS-RNS-Hybrid war vor der einzelstrangspezifischen Spaltung der S1-Nuklease geschützt = 2.)

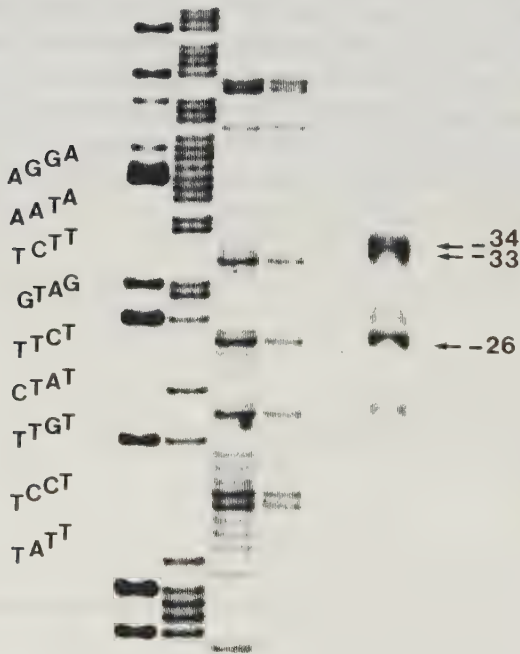


Abbildung 14b:

Auftrennung der DNS-RNS-Hybride auf Sequenzgelen.
Die Auftrennung der Maxam-Gilbert-Sequenzierungsansätze des TaqI/HaeIII-Fragments neben dem S1-Ansatz diente der Identifizierung der Startstellen der Transkription. Die Lokalisation erfolgte nach der Korrekturvorschrift von Sollner-Webb und Reeder (67).

Die S1-Kartierung gelang schließlich mittels Hybridisierung des codogenen Einzelstrangs gegen die angereicherte poly (A)⁺-RNS des Stammes DBY747 (s. Abb. 14). Das Auftreten von mehreren Banden zeigte, daß die SUP1-Transkripte heterogene Startpositionen aufwiesen. Die genaue Zuordnung ergab, daß der Start der Haupttranskripte an den Positionen -34/-33 bzw. -26 erfolgte.

XI. Eindimensionale und zweidimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine

Die vergleichende gelelektrophoretische Auftrennung ribosomaler Proteine der Stämme DBY747 (kein Suppressor), 7B-D244 (sup1-ts36) und 6B-D244 (sup2-ts36) aus den 80S-Ribosomen, sowie den 40S und 60S Untereinheiten isoliert, hatte das Ziel eventuelle Veränderungen im Laufverhalten dieser Proteine nachzuweisen.

Alle Versuche, mit einem zweidimensionalen Gelsystem ((55), nicht gezeigt) Unterschiede nachzuweisen, blieben ohne Erfolg. Sowohl die Auftrennung von ribosomalem Gesamtprotein als auch der Proteine der 40S und 60S Untereinheiten zeigte bei beiden Suppressorstämmen keinerlei reproduzierbare Veränderungen gegenüber Stamm DBY747. Eine hochauflösende Auftrennung der 60S Untereinheitenproteine der Stämme 6B-D244 bzw. 7B-D244 vergleichend mit Stamm DBY747 auf eindimensionalen Gelen nach Lämmli (54) ließ kein Protein mit abweichendem Laufverhalten erkennen (nicht gezeigt).

Lediglich die Auftrennung der ribosomalen Proteine der 40S Untereinheit mit diesem Gelsystem wies bei Stamm 6B-D244 eine charakteristische und reproduzierbare Veränderung des Bandenmusters im Bereich der 20 kd bis 30 kd großen Proteine auf (Abb. 15). Eine Identifizierung des oder der anders wandernden Proteine gelang jedoch nicht.

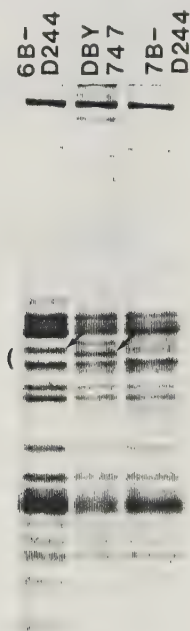


Abbildung 15:

Auftrennung der ribosomalen Proteine der 40S Untereinheit der Stämme 6B-D244, 7B-D244 und DBY747 mit dem eindimensionalen Gelsystem nach Lämmli. Im Bereich, der mit einer Klammer gekennzeichnet ist, weicht das Proteinmuster des Stammes 6B-D244 (sup2-ts36) vom Proteinmuster des Stammes DBY 747 ab.

D. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Genortes SUP1 und seines Produkts, eines von fünf omnipotenten Suppressoren von *S. cerevisiae*. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob die Suppressormutante auf der Veränderung eines ribosomalen Proteins beruhte. Mögliche Wege zu einer derartigen Veränderung bestehen in der Mutation des Strukturgens oder eines Gens für ein modifizierendes bzw. prozessierendes Enzym. Für diese Annahme sprachen folgende Eigenschaften des Suppressorphenotyps:

- Die Temperatursensitivität, die in Zusammenhang mit Defekten im cytoplasmatischen Translationsapparat gebracht werden konnte (6).
- Die erhöhte in vitro "misreading"-Rate, die eindeutig der 40S Untereinheit des Ribosoms zugeordnet wurde (19).
- Die Hypersensitivität gegenüber Aminoglykosidantibiotika wie z.B. Paromomycin (in vivo und in vitro, (17)).
- Die Analogie zu *E. coli*, wo in entsprechenden Mutanten der Zusammenhang zwischen ribosomaler Ambiguität und veränderten ribosomalen Proteinen nachgewiesen wurde (21).
- Die Omnipotenz und Rezessivität des Suppressors, die ein verändertes tRNA-Molekül als Ursache unwahrscheinlich machten.

I. Startpunkte für Transkription und Translation

Wie aus der zuerst bestimmten DNS-Sequenz (s. Abb. 12) ersichtlich war, folgten auf das ATG-Triplett, das als funktionelles Startcodon der Translation zunächst angenommen wurde, weitere potentielle Startcodons in demselben Leserahmen. Es war daher notwendig den Startpunkt der Transkription und Translation festzulegen. Die Daten der Nuklease S1-Kartierung ergaben zwei hauptsächlich Startpunkte der Transkription 26 und 33 bzw. 34 Nukleotide "upstream" des ersten ATG-Tripletts, das in 3'-Richtung auf der mRNS folgt. Multiple Transkriptionsstartpunkte sind für Hefegene in der Literatur berichtet (68) und scheinen allgemein ein Charakteristikum eukaryontischer Transkription durch RNS-Polymerase II zu sein. Die für Hefe berichtete Consensussequenz der sogenannten CAP-Stelle, der eigentlichen Transkriptionsinitiationsstelle, lautet PyAAPu. Sowohl der Startpunkt an Position -34, als auch der Startpunkt an Position -26 (bezogen auf das erste der nachfolgenden ATG-Tripletts) gehorchen den Consensusregeln und fallen auf ein G bzw. auf ein A.

Nach dem "scanning"-Modell (69) erfolgt in Hefe immer am ersten ATG, das auf der mRNS unterhalb des 5'-Endes erscheint, der Start der Translation. Während in Prokaryonten die zehn Nukleotide direkt vor dem funktionellen ATG sehr purinreich sind, erscheinen die Sequenzen in der direkten Umgebung des Start-ATG's der Hefe sehr variabel. Lediglich

von den zwei Positionen -3 und +4 ist bekannt, daß bestimmte Nukleotide konserviert sind. Die folgende Consensussequenz gilt (70):

```

-3      +4
  A      XXATGG
  C
```

Das erste Startcodon, das in den SUP1-Transkripten erscheint ist im Einklang mit obiger Sequenz und lautet:

```

-3      +4
  ATAATGG
```

Innerhalb von 140 Nukleotiden von diesem Start-triplett folgen zwei weitere ATGs, die jedoch von der Consensussequenz abweichen. Diese Tatsache, die auch von den Komplementationsdaten gestützt wird, weist auf das festgelegte ATG als funktionelles Startcodon hin. Ein eindeutiger Beweis für die Verwendung dieses Translationsstarts muß jedoch noch durch die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SUP1-Proteins erbracht werden.

II. Interpretation der Nukleotidsequenz und der davon abgeleiteten Primärstruktur des SUP1-Proteins

Der in Abbildung 12 gezeigte offene Leserahmen codierte ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 49 kd und wies kein Intron auf. Die mittleren

Molekulargewichte der ribosomalen Proteine der Hefe variieren zwischen 21 kd (71) und 19,2 kd für Proteine der 60S Untereinheit bzw. 18,5 kd für Proteine der 40S Untereinheit (72). Die Molekulargewichte der größten Proteine des 80S Ribosoms der Hefe finden sich um Werte von 40 kd. Protein L3 (73) ist mit einem Molekulargewicht von 43,5 kd das größte Protein der 60S Untereinheit, das in stöchiometrischer Menge vorkommt. Bisher wurde jedoch kein ribosomales Protein identifiziert, daß ein Molekulargewicht von ca. 50 kd aufgewiesen hätte. Die Größe des potentiellen SUP1-Proteins sowie die Tatsache, daß es im Gegensatz zu den meisten beschriebenen ribosomalen Proteinen der Hefe kein Intron auswies (64) erlauben die vorläufige Schlußfolgerung, daß das SUP1-Gen nicht für ein ribosomales Protein codiert.

Auch die Analyse der Häufigkeit, mit der die 20 Aminosäuren von den verschiedenen Tripletts codiert werden ("codon-usage"), widerspricht der Hypothese, daß es sich um ein ribosomales Protein handelt.

In Hefe gilt generell, daß der sogenannte "bias" (= bevorzugte Auswahl bestimmter Tripletts, deren Codons zu den Anticodons der Hauptspezies der verschiedenen tRNS-Moleküle komplementär sind) streng mit der Stärke der Expression eines Gens korreliert ist. So werden z.B. in stark exprimierten Genen, dazu gehören auch diejenigen für ribosomale Proteine, alle Aminosäuren fast ausschließlich von nur 25 "bevorzugten" Codons der insgesamt 61 codogenen Trip-

letts codiert (74). Im SUP1-Gen reichen 22 Tripletts aus, um damit 55 % der Aminosäuren zu codieren. Der entsprechende Wert des ribosomalen Hefeproteins L16, der stellvertretend für die in stöchiometrischen Mengen synthetisierten ribosomalen Proteine ermittelt wurde, beträgt etwa 80 %. Der Vergleich der Verwendung ausgewählter Tripletts zeigt noch deutlicher, daß die "codon-usage" des SUP1-Gens völlig von der ribosomalen Proteingene abweicht.

Stark exprimierte Gene benutzen für Aminosäuren mit drei- oder vierfach degeneriertem Code ($XY \begin{smallmatrix} T/C \\ A/G \end{smallmatrix}$) in gleichem Umfang die Tripletts XYT und XYC unter fast völliger Vermeidung des Paares XYA/G. Tabelle 6 zeigt, bis zu welchem Grad das SUP1-Gen und das ribosomale Protein L16 diese Regel befolgen.

Tabelle 6: Verhältnis der Häufigkeit der Verwendung der Codonpaare XYT/C bzw. XYA/G

$\frac{XYT/C}{XYA/G}$	SUP1-Gen	ribosomales Protein L16
Ser	24 : 4	9 : 0
Ile	24 : 3	10 : 0
Val	29 : 3	14 : 1
Thr	17 : 7	11 : 1
Ala	22 : 2	7 : 0
Pro	6 : 4	4 : 1
Gly	30 : 1	15 : 0

Das SUP1-Gen befolgt die "bias"-Regel für keine der genannten Aminosäuren strikt. Im Falle des L16-Gens

geschieht dies in vier von sieben Fällen. Bei den drei verbleibenden Aminosäuren wird die Regel nur jeweils einmal unterbrochen.

Eine weitere "bias"-Regel besagt, daß Aminosäuren mit zweifacher Degeneriertheit und einem Pyrimidinrest in der "wobble"-Position in stark exprimierten Genen bevorzugt durch das Triplet XYC codiert werden. Tabelle 7 zeigt die entsprechende Verwendung innerhalb des SUP1-Gens und des ribosomalen Proteins L16.

Tabelle 7: Verhältnis der Häufigkeit der Verwendung der Triplets XYC bzw. XYT

XYC XYT	SUP1-Gen	ribosomales Protein L16
Phe	14 : 9	8 : 0
His	0 : 4	3 : 0
Asn	8 : 14	7 : 0
Tyr	13 : 4	3 : 2

Mit Ausnahme der Aminosäure Tyrosin folgt das L16-Gen der "bias"-Regel. Die Häufigkeit der Verwendung der beiden Codons im SUP1-Gen dagegen scheint mehr oder weniger statistisch zu sein (kein "bias"). Im Falle der Aminosäure Histidin wird ausschließlich das "falsche" Triplet benutzt.

Um eine näherungsweise Angabe der Expressionsstärke machen zu können, wurde für das SUP1-Gen und das Gen L16 nach den Angaben von Bennetzen und Hall (74)

der sogenannte "bias-index" ermittelt. Dabei ist der Maxiamlwert eines codierenden Leserahmens 1,0, wenn alle zu Grunde liegenden "bias"-Regeln strikt befolgt sind. Für das SUP1-Gen wurde ein Wert von ca. 0,5 ermittelt. Der "bias-index" des L16-Gens betrug ca. 0,8. Aus Vergleichswerten (74) läßt sich daraus eine etwa zehnmal stärkere Expression des ribosomalen Proteins, verglichen mit derjenigen des Suppressors errechnen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Himmelfarb et al. (63), die via "Northern"-Analyse die Expressionsrate des SUP45 (SUP1)-Gens vergleichend mit der Rate ribosomaler Proteine der Hefe bestimmten.

Ein weiterer, wenn auch schwacher Anhaltspunkt, daß das SUP1-Gen wahrscheinlich kein ribosomales Protein ist, ergibt sich aus der Analyse der Primärstruktur des SUP1-Proteins:

- (i) Die N-terminalen Proteinsequenzen der ribosomalen Hefeproteine L17a und L25 sind, wie bei der Mehrzahl der ribosomalen 80S-Proteine, extrem basisch (75). Innerhalb der ersten 55 Aminosäurereste befinden sich keine "sauren". Das Protein des Suppressors weist in dieser Region jedoch 7 acide Aminosäureseitengruppen auf.
- (ii) Der Vergleich mit bereits publizierten Primärstrukturen der N-Termini ribosomaler Proteine von *S. cerevisiae* zeigte keinerlei Homologie

Die vergleichende Analyse der 5' "upstream"-Sequenzen des SUP1-Gens und der entsprechenden Sequenzen einer Anzahl von ribosomalen Proteinen ergab ebenfalls keine deutliche Übereinstimmung mit den entsprechenden Regio-

nen oberhalb ribosomaler Proteingene. Die meisten der untersuchten ribosomalen Proteingene (64) weisen 5'-konservierte DNS-Sequenzen auf, die sich in charakteristischen Abständen zu den ATG-Startcodons befinden. Die Autoren vermuten eine Funktion dieser Homologieregionen bei der Kontrolle der koordinierten Transkription der ribosomalen Proteine. In der entsprechenden Region des SUP1-Gens fand sich lediglich ein Oligonukleotid, das einer dieser Sequenzen (Homologieregion I) ähnelte und in einem Abstand vom Startcodon lag, der auch für die ribosomalen Proteingene typisch ist. Die Abbildung 16 zeigt vergleichend die SUP1-Sequenz und die HOMOL1 genannte Consensussequenz des Oligonukleotids.

HOMOL1 (Consensus- sequenz)	5'	AACATC	TG	G	CA	3'
			CA	A		
SUP1			-246			
	5'	AtCATt	TG	TACA		3'

Abbildung 16:

Vergleich der Sequenz HOMOL1 (-254 bis -357 Basenpaare 5' des Genstarts, (64)) mit einer ähnlichen Sequenz aus der 5'-Region des SUP1-Gens. Kleine Buchstaben stehen an Positionen, wo die SUP1-Sequenz von der Consensussequenz abweicht. Vergleiche dazu auch Abbildung 12.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich ist, weicht die SUP1-Sequenz, die möglicherweise der Sequenz HOMOL1 entspricht, an zwei Positionen von der Consensussequenz ab. In zwei von acht untersuchten Genen für riboso-

male Proteine fehlt diese Sequenz jedoch völlig in den bisher bestimmten "upstream"-Abschnitten. Dies könnte andeuten, daß die angesprochene Transkriptionskontrolle eine Funktion aller Homologiebereiche ist, wobei jeweils einzelne Sequenzen verzichtbar sind. Die Anwesenheit dieser Homologieregion könnte ferner bedeuten, daß das Suppressorgen in die Transkriptionskontrolle der ribosomalen Proteingene mit einbezogen ist, jedoch mit erniedrigter Expressionsrate. Die Frage nach der Funktion der "upstream"-Sequenzen oberhalb der Gene ribosomaler Proteine, sowie im SUP1-Gen, müssen jedoch durch weitere Untersuchungen, wie z.B. durch Deletionsstudien mit nachfolgender Bestimmung der Expression geklärt werden.

Alle geschilderten Ergebnisse zusammengefaßt läßt sich vorläufig schließen, daß das SUP1-Gen im Gegensatz zu den omnipotenten Suppressor SUP46 (22) nicht das Strukturgen eines ribosomalen Proteins ist.

III. Das Suppressorallel *sup1-ts36*

Ein Austausch der Aminosäure Leucin in Position 34 der Aminosäurekette gegen Serin konnte als Mutationsereignis, daß zum *sup1-ts36* Allel führt, identifiziert werden. Damit kommt dem N-terminalen Bereich des Proteins zentrale Bedeutung für seine Funktion zu. Ein Hinweis, daß im Gegensatz dazu das C-terminale Ende des Proteins nicht von gleich essentieller Bedeutung für die Funktion des SUP1-Proteins ist, ergab sich aus den Komplementationanalysen (s. C. .

I. 2). Durch die Insertion des 2,65 kb BamHI/XbaI-Fragments in die Tetracyclinresistenzregion des Vektors p3030 mußte ein um 32 Aminosäuren verlängertes Fusionsprodukt entstehen, dessen veränderte C-terminale Aminosäuresequenz in Abbildung 17 gezeigt ist. Auch dieses Fusionsprotein war in der Lage, alle pleiotropen Effekte des *sup1-ts36* Allels zu komplementieren.

SUP1-Protein: Glu-Gly-Ser-Asp-Tyr-Asp-Phe-Ile

SUP1: p3030: Glu-Gly-Ser-33AS-Thr-Ser-Gly-Ser
(Fusion)

Abbildung 17:

Vergleich der C-Termini des SUP1-Proteins mit dem SUP1: p3030-Fusionsprotein.

Von den außerhalb des offenen Leserahmens liegenden Nukleotidaustauschen waren die bereits angesprochene Deletion eines Thymidinrestes (Position -230 bis -234) bzw. die Insertion dieses Nukleotids (Position -159 bis -164) jeweils in einer Abfolge von fünf bzw. sechs Thymidinresten bemerkenswert. Beide Ereignisse fanden in der Region zwischen der Sequenz HOMOL1 und dem Startpunkt der Translation statt, also in einer Region, die eine mögliche Bedeutung bei der Transkriptionskontrolle hat. Das Austauschexperiment (s. C. IX) konnte eine potentielle Bedeutung dieser Veränderung nicht klären, da die entsprechende Region jeweils zusammen mit der Transition in Position 101 (T zu C) ausgetauscht wurde. Wahrscheinlich ist jedoch, daß

sich die Insertion und die Deletion jeweils einer Base gegenseitig aufheben.

I. Möglicher Suppressionsmechanismus und mögliche Funktionen des SUP1-Faktors

Wie in der Einleitung bereits ausführlich beschrieben, können Veränderungen in mehreren Komponenten des Translationsapparats (tRNS-Moleküle, ribosomale Proteine) zur translationellen Suppression führen. Da es sich bei dem SUP1-Protein offenbar nicht um ein gewöhnliches ribosomales Protein handelt, muß unter Umständen die Zahl der bisher in Frage kommenden Zielorte erweitert werden.

Eine mögliche Funktion des SUP1-Faktors könnte in der Modifikation oder proteolytischen Veränderung einer anderen Komponente (RNS oder Protein) des Translationsapparats bestehen.

Für *E. coli* wurde gezeigt, daß sowohl die supprimierende Aktivität der ram-Mutationen (76) als auch die "misreading"-induzierende Wirkung des Streptomycins auf einer verminderten Korrekturleseaktivität ("proofreading") beruht, die bei der Auswahl der kognaten Aminoacyl-tRNS-Moleküle der Codon-Anticodon vermittelten ersten Auswahl ("initial selection") folgt.

Die bereits erwähnte Parallele zwischen ram-Mutanten und Streptomycinwirkung bzw. omnipotenten Suppressoren der Hefe und Paromomycinwirkung könnte bedeuten, daß die Aktivität der Hefesuppressoren ebenfalls auf einer verminderten "proofreading"-Aktivität beruht. In Er-

weiterung des bakteriellen Kontrollmechanismus könnten jedoch zusätzliche Faktoren in Eukaryonten vorhanden sein, die am Prozess des Korrekturlesens beteiligt sind. Während der Evolution sollte ein solcher Faktor weitgehend konserviert worden sein. Eine Homologiesuche mittels Hybridisierung von SUP1-DNS gegen genomische DNS von Mensch, Maus und Weizen ergaben jedoch keinerlei Hinweise, daß dies der Fall ist.

Weitere Hinweise auf die Funktion des SUP1-Faktors sollte ein Vergleich der SUP1-Sequenz (durchgeführt auf der Ebene der DNS- und der Proteinsequenz) mit den Sequenzen einer Datenbank erbringen. Eventuelle Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Genen bzw. Genprodukten hätten zur Klärung der Natur des Suppressors beitragen können. Keine der gefundenen Homologien war jedoch so ausgeprägt, daß z.B. eine gleiche Enzymfunktion zwingend zu belegen war. Die in Abbildung 18 gezeigte kurze Homologie mit der Methionyl-tRNS-Synthetase der Hefe (78) und auch Homologien zu ähnlichen Enzymen aus *E. coli* (nicht gezeigt) könnte mit einer Funktion des Suppressors bei der Erkennung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung in Einklang gebracht werden. Neben einer tRNS-bindenden Funktion könnte hierdurch auch eine Nukleosidtriphosphat-bindende und -spaltende Aktivität angedeutet werden. Jedoch fehlen die für GTP-spaltende Proteine typischen Sequenzähnlichkeiten (79).

Weitere Homologiebefunde, bei Vorliegen einer wesentlich erweiterten Datenbank eukaryontischer Proteinsequenzen, könnte in Zukunft bessere Hinweise auf die Funktion liefern.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Charakterisierung des Genorts des omnipotenten, rezessiven Suppressors *supl* der Hefe *S. cerevisiae* sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob ein verändertes ribosomales Protein, wie für das Hefesuppressorgen SUP46 und die *ram*-Mutanten vom *E. coli* gezeigt, Ursache der Suppressoraktivität ist.

Das DNS-Fragment, welches das *supl-ts36* Allel komplementieren konnte, wurde sequenziert. Die Computeranalyse ergab einen langen offenen Leserahmen, der ein Protein der Größe 49 kd codieren konnte.

Die Eigenschaften dieses potentiellen SUP1-Proteins aber auch die Charakteristika des Genorts selbst, insbesondere der 5'-"upstream" liegenden Sequenzen, führten zu der Schlußfolgerung, daß das SUP1-Genprodukt kein ribosomales Protein ist. Folgende Resultate belegen dies:

- Mit Ausnahme der sogenannten Homologieregion 1 fehlen alle für die 5'-"upstream" Regionen ribosomaler Proteingene charakteristischen Homologiesequenzen.
- Der offene Leserahmen war nicht von intervenierenden Sequenzen unterbrochen.
- Die "codon-usage" des *supl*-Gens weicht von der ribosomaler Proteine ab und deutet an, daß der Suppressor nicht in gleicher Menge mit den ribosomalen Proteinen synthetisiert wird. Himmelfarb

et al. (63) gelangten durch vergleichende Bestimmung der Transkriptionsraten des *sup1*-Gens und der Gene ribosomaler Proteine ebenfalls zu diesem Ergebnis.

- Die Aminosäurezusammensetzung des SUP1-Proteins zeigte, daß ein IEP im Sauren erwartet werden konnte. Ein Charakteristikum der meisten ribosomalen Proteine ist ihr basischer Charakter.

Die DNS-Sequenz des *sup1-ts36* Allels wies verglichen mit dem WT-Allel mehrere Basensubstitutionen auf, die mit einer Ausnahme in der "Wobble"-Position erfolgt waren. Lediglich die Transition von T zu C in Position 101 des offenen Leserahmens führte zum Austausch der Aminosäure Leucin gegen Serin. Durch den reziproken Austausch von DNS-Fragmenten wurden SUP1/*sup1-ts36*-Hybridplasmide konstruiert, mit denen nachgewiesen wurde, daß der Leucin → Serin-Austausch von funktionseller Bedeutung war.

Die Auftrennung der ribosomalen Proteine von Stämmen mit dem Suppressorgen *sup1* bzw. *sup2* ließ bei dem *sup1*-Stamm kein Protein mit einem veränderten Laufverhalten erkennen. Das Auftrennungsmuster der Proteine der 40S Untereinheit eines *sup2*-Stammes wich jedoch vom Muster des Referenzstammes ab. Möglicherweise codiert also auch das *sup2*-Gen wie das SUP46-Gen ein ribosomales Protein der kleinen Untereinheit des Ribosoms.

Ohne die Kenntnis der Natur des SUP1-Genprodukts waren eindeutige Aussagen über die genaue Funktion dieses Suppressors nicht zu treffen. Mögliche Wege, auf denen das SUP1-Genprodukt als Suppressor wirken könnte wurden diskutiert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Hopfield JJ, Yamane T (1979)
In: Ribosomes: Structure, Function and Genetics
Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davies K, Kahan L,
Nomura M (eds) University Park Press, Baltimore
- (2) Hirsh D (1971)
J Mol Biol 58: 459 - 468
- (3) Hachiro J, Hoben P, Yamao F, Ozeki H, Söll D (1984)
Proc Natl Acad Sci USA 81: 5076 - 5080
- (4) Inge-Vechtomov SG, Adrianova VM (1970)
Genetika (UdSSR) 11: 103 - 115
- (5) Hawthorne DC, Leupold U (1974)
Curr Topic Microbiol Immunol 64: 1929 - 1933
- (6) Gerlach WL (1975)
Mol Gen Genet 138: 53 - 63
- (7) Masurekar M, Palmer E, Bun-Ichiro Ono, Wilhelm JM,
Sherman F (1981)
J Mol Biol 147: 373 - 379
- (8) Bun-Ichiro Ono (1981)
J Mol Biol 147: 373 - 379
- (9) Eustice DC, Wakem LP, Wilhelm JM, Sherman F (1986)
J Mol Biol 188: 207 - 214
- (10) Sherman F (1982)
In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces
Strathern J, Jones EN, Broach JR (eds) Cold Spring
Harbor Laboratory
- (11) Gorini L (1974)
In: Ribosomes: Nomura M, Tissières A, Lengyel P
(eds) Cold Spring Harbor Laboratory, New York

- (12) Piepersberg W, Böck A, Wittmann HG (1975)
Mol Gen Genet 140: 91 - 100
- (13) Gerlach WL (1976)
Mol Gen Genet 144: 213 - 215
- (14) Surguchov AP, Fominykh ES, Berestetskaya YV,
Smirnov VN, Inge-Vechtomov SG (1980)
Mol Gen Genet 177: 675 - 680
- (15) Smirnov VN, Surguchov AP, Fominykh ES, Lizlova LV,
Saprygina TV, Inge-Vechtomov SG (1976)
FEBS Letters 66: 12 - 15
- (16) Surguchov AP, Fominykh ES, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD,
Mironova LN, Inge-Vechtomov SG (1981)
Biochim Biophys Acta 654: 149 - 155
- (17) Mironova LN, Provorov NA, Ter-Avanesyan MD, Inge-Vechtomov SG,
Smirnov VN, Surguchov AP (1982)
Curr Genet 5: 149 - 152
- (18) Palmer E, Wilhelm JM, Sherman F (1979)
Nature 277: 148 - 149
- (19) Singh A, Ursic D, Davies J (1979)
Nature 277: 146 - 148
- (20) Peters M, Yarns M (1979)
J Mol Biol 134: 474 - 491
- (21) Piepersberg W, Geyl D, Hummel H, Böck A (1980)
In: Genetics and Evolution of RNA Polymerase, tRNA and Ribosomes, Osawa S, Ozeki H, Uchida H, Yura T (eds) University of Tokyo Press, Tokyo
- (22) Ishiguro J, Bun-Ichiro Ono, Masurekar M, Mc Laughlin CS, Sherman F (1981)
J Mol Biol 147: 391 - 397

- (23) Liebmann SW, Cavenagh M, Bennett LN (1980)
J Bac 143: 1527 - 1529
- (24) Piepersberg W, Noseda V, Böck A (1979)
Mol Gen Genet 171: 23 - 24
- (25) Cabezón T, Herzog A, De Wilde M, Villarriol R,
Bollen A (1976)
Mol Gen Genet 144: 59 - 62
- (26) Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969)
J Mol Biol 41: 459 - 472
- (27) Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC,
Heyneker HL, Boyer HW (1977)
Gene 2: 95 - 113
- (28) Chang ACY, Cohen SN (1978)
J Bacteriol 134: 1141 - 1156
- (29) Broach JR, Strathern JN, Hicks JB (1979)
Gene 8: 121 - 133
- (30) Hohn B, Hinnen A (1980)
In: Genetic Engineering Vol 2, Setlow JK, Hol-
laender A (eds), Plenum Press, New York-London
- (31) Breining P, Surguchov AP, Piepersberg W (1984)
Curr Genet 8: 467 - 470
- (32) Nasmyth KA, Reed SJ (1980)
Proc Natl Acad Sci USA 77: 2119 - 2123
- (33) Kado CJ, Liu ST (1981)
J Bacteriol 145: 1365 - 1373
- (34) Ish-Horowicz, Burke JF (1981)
Nucl Acids Res 9: 2989 - 2998
- (35) Clewell DB, Helinski DR (1969)
Proc Natl Acad Sci USA 62: 1159 - 1166

- (36) Cryer DR, Eccleshall R, Marmur J (1975)
Methods in Cell Biology, Vol XII, Prescott DM (ed)
- (37) Domdey H, Apostol B, Liu RJ, Newmann A,
Brody E (1984)
Cell 39: 611 - 621
- (38) Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982)
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory,
New York
- (39) Peacock AC, Dingman CW (1969)
Biochemistry 7: 668 - 674
- (40) Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972)
Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110 - 2114
- (41) Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 1929 - 1933
- (42) Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983)
J Bacteriol 153: 163 - 168
- (43) Maxam AM, Gilbert W (1980)
In: Methods in Enzymology 65, Grossmann L, Mol-
dave K (eds)
- (44) Gray CP, Sommer R, Polke C, Beck E, Schaller H
(1978)
Proc Natl Acad Sci USA 75: 50 - 53
- (45) Grunstein M, Hogness DS (1975)
Proc Natl Acad Sci USA 72: 3961 - 3965
- (46) Southern EM (1975)
J Mol Biol 98: 503 - 517
- (47) Barinaga M, Franko R, Meinkoth J, Ing E, Wahl GM
(1981)
Schleicher & Schuell Manual ISF 9/82 SM

- (48) Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H (1977)
Biochemistry 16: 4743 - 4751
- (49) Thomas PS (1980)
Proc Natl Acad Sci USA 77: 5201 - 5205
- (50) Berk AJ, Sharp PA (1977)
Cell 12: 721 - 732
- (51) Weaver RF, Weissmann C (1979)
Nucl Acids Res 7: 1175 - 1195
- (52) Roeder GS, Fink GR (1980)
Cell 21: 239 - 249
- (53) Cummins CM, Culbertson MR (1981)
Gene 14: 263 - 278
- (54) Lämmler UK (1970)
Nature 227: 680 - 685
- (55) Geyl D, Böck A, Osono K (1981)
Mol Gen Benet 181: 309 - 312
- (56) Ricciardi RP, Miller JS, Roberts BE (1979)
Proc Natl Acad Sci USA 76: 4927 - 4931
- (57) Pelham HRB, Jackson RJ (1976)
Eur J Biochem 67: 247 - 256
- (58) Larson R, Messing J (1983)
DNA 2: 31 - 35
- (59) Mortimer RK, Schild D (1980)
Microbiol Rev 44: 519 - 571
- (60) Hennecke H, Günther J, Binder F (1982)
Gene 19: 231 - 234
- (61) Rubtsov PM, Musakhanov MM, Zakharyev VM, Krayev AS,
Skryabin KG, Bayer AA (1980)
Nucl Acids Res 8: 5779 - 5794

- (62) Gergiev OJ, Nikolaev N, Hadjiolova AA, Skryabin KG, Zakharyev VM, Bayer AA (1981)
Nucl Acids Res 9: 6953 - 6958
- (63) Himmelfarb HJ, Maicas E, Friesen JD (1985)
Mol Cell Biol 5: 816 - 822
- (64) Teem JL, Abovich N, Kaufer NF, Schwindinger WF, Warner JR, Levy A, Woolford J, Leer RJ, van Raamsdonk-Duin MMC, Mager WH, Planta RJ, Schultz L, Friesen JD, Fried H, Rosbash M (1984)
Nucl Acids Res 12: 8295 - 8312
- (65) Crick FHC (1966)
J Mol Biol 19: 548 - 555
- (66) Casey J, Davidson N (1977)
Nucl Acids Res 4: 1539 - 1552
- (67) Sollner-Webb B, Reeder RH (1979)
Cell 18: 485 - 499
- (68) Lusty CJ, Widgren EE, Broglie KE, Nyuno H (1983)
J Biol Chem 258: 14466 - 14472
- (69) Kozak M (1980)
Cell 22: 7 - 8
- (70) Kozak M (1981)
Nucl Acids Res 9: 5233 - 5252
- (71) Otaka E, Kobata K (1978)
Mol Gen Genet 162: 259 - 268
- (72) Kruiswijk T, Planta RJ (1975)
FEBS Letters 58: 102 - 105
- (73) Schultz LD, Friesen JD (1983)
J Bacteriol 155: 8 - 14
- (74) Bennetzen LJ, Hall BD (1982)
J Biol Chem 257: 3026 - 3031

- (75) Leer RJ, van Raamsdonk-Duin MMC, Hagendorn JM,
Mager WM, Planta RJ (1984)
Nucl Acids Res 12: 6685 - 6700
- (76) Andersson DJ, Kurland CG (1983)
Mol Gen Genet 191: 378 - 381
- (77) Ruusala T. Kurland CG (1984)
Mol Gen Genet 198: 100 - 104
- (78) Walter P, Gangloff J, Bonnet J, Boulanger Y,
Ebel JP, Fasiolo F (1983)
Proc Natl Acad Sci USA 80: 2437 - 2441
- (79) Lacal JC, Anderson PS, Aaronson SA (1986)
EMBO J 5: 679 - 687

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Peter Breining
Geburtstag, Geburtsort:	10. März 1955 in Kirchheim/Teck
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1962 - 1966	Grundschule in Kirchheim/Teck
1966 - 1974	Schloßgymnasium in Kirchheim/Teck
1974 - 1976	Grundwehrdienst
1977 - 1982	Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
Oktober 1982	Abschluß des Studiums mit dem Diplom
ab November 1982	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter Anleitung von Herrn Prof. W. Piepersberg

Herrn Prof. Dr. W. Piepersberg möchte ich sehr herzlich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine hilfreichen Ratschläge und seine stimulierende Diskussionsbereitschaft sowie für die wissenschaftliche Förderung, die er mir zuteil werden ließ, danken.

Fräulein Claudia Maskos möchte ich besonders herzlich für die Reinschrift dieser Arbeit danken.

